

DER ARCHAEBAKTERIELLE
TRANSLATIONSAPPARAT -
STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE
ASPEKTE

Konrad Lechner

Disbui. München

1988

DER ARCHAEBAKTERIELLE TRANSLATIONSAPPARAT -
STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Konrad Lechner
aus
München

Mai 1988

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Jäckle
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1988

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	8
I. Verwendete Organismen und Plasmide	8
II. Medien	13
1. Methanococcus-Medium	13
2. Halobacterium-Medium	14
3. Hefe-Selektivmedium	14
4. LB-Medium	14
5. Trypton Broth	15
6. WM-Minimalmedium	15
III. Aufbewahrung von Kulturen und Anzuchtbedingungen	16
1. Aufbewahrung von Kulturen	16
2. Anzuchtbedingungen	16
IV. Vermehrung von Bakteriophagen	16
V. Immunologische Methoden	17
1. Präparation von Antiserum	17
2. Immunoblot-Experimente	17
VI. Peptidsequenzierung	18
VII. Molekulargenetische Methoden	18
1. Isolierung von DNS	18
2. Isolierung von RNS	19
3. In vitro Rekombination von DNS	19
a) Spaltung von DNS mit Restriktionsendonucleasen	19
b) Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS	19
c) Behandlung von DNS-Fragmenten zur Erzeugung stumpfer Enden	21
d) Ligation von DNS-Fragmenten	21
4. Transformation und Transfektion von E. coli-Zellen	21
5. Verpackung von Cosmid- bzw. λ -DNS	22
6. Markierung von DNS mit ^{32}P -Phosphat	22
a) Endmarkierung von DNS-Fragmenten	22
b) "Nick-Translation"	22
7. Hybridisierungsexperimente	22
a) DNS/DNS-Hybridisierungen	22

b) DNS/RNS-Hybridisierungen	23
8. Verkürzung von DNS-Fragmenten mittels Exonuclease III	24
9. DNS-Sequenzierung	24
a) basenspezifische Sequenzreaktionen	24
b) Polyacrylamidgelelektrophorese	25
c) Computeranalyse	25
10. Bestimmung von Transkriptionssignalen mit Nuclease S1	25
a) Bestimmung der Transkriptionsstartstelle	25
b) Bestimmung der Transkriptionsterminationsstelle	26
VIII. Ansatz zur ADP-Ribosylierung von EF-2	26
IX. Enzyme und Chemikalien	27
C. Ergebnisse	28
I. Klonierung des Gens für EF-1 α aus <i>M. vanniellii</i>	28
1. Heterologe Hybridisierung	28
a) heterologe Hybridisierung mit <i>E. coli</i> tufB-DNS	28
b) Klonierung in verschiedene Plasmide	30
c) Anlage einer Cosmidbank	31
2. "Immunscreen" zur Klonierung des Gens	31
3. Sequenzielle Klonierung	32
4. Rückhybridisierung	34
5. Immunologische Identifizierung	35
II. Sequenzierung und Analyse des Gens für EF-1 α	36
1. Sequenzierstrategie	36
2. Nukleotidsequenz des Gens und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz	37
3. Untersuchung der N-terminalen Aminosäuresequenz des Elongationsfaktors 1 α	39
4. Homologisierung der Aminosäuresequenzen	39
5. Ähnlichkeit und phylogenetische Distanz	42
a) Berechnung der Ähnlichkeit	43
b) Ermittlung der Mutationsdistanzen	43
6. Hybridisierung mit chromosomaler DNS aus <i>T. tenax</i> und <i>H. halobium</i>	45

III.	Klonierung und Sequenzierung von flankierenden DNS-Bereichen aus <i>Methanococcus</i>	46
1.	Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie	46
2.	Gen für den Elongationsfaktor 2	49
a)	DNS- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz	49
b)	Vergleich von EF-2 Sequenzen	52
IV.	DNS-Sequenz und Analyse der an die Gene für EF-2 und EF-1 α angrenzenden Regionen	55
1.	Gen für die Untereinheit β' der RNS-Polymerase	59
2.	ORF 1 und ORF 2	60
3.	<i>Methanococcus</i> Protein mit Homologie zum ribosomalen Protein S12 aus Eubakterien	61
4.	<i>Methanococcus</i> Protein mit Homologie zum ribosomalen Protein S7 aus Eubakterien	63
5.	<i>Methanococcus</i> Protein mit Homologie zum ribosomalen Protein S10 aus Eubakterien	64
6.	Sequenzen stromabwärts des Gens für S10	65
V.	Untersuchung der Operonstruktur der beschriebenen Gene	66
1.	"Northernblot"-Experimente	66
2.	Bestimmung von Initiationsstelle und Terminationsstelle der Transkription	68
3.	Initiation der Translation	71
4.	Kodonauswahl	72
5.	Vergleich der Organisation der untersuchten Gene mit derjenigen in <i>E. coli</i>	74
VI.	Versuche zur ADP-Ribosylierbarkeit von <i>Methanococcus</i> EF-2 nach Umklonierung des Gens in Hefe	76
D.	Diskussion	79
E.	Zusammenfassung	92
F.	Literaturverzeichnis	94

Abkürzungen

A	Adenosin
Ap	Ampicillin
C	Cytidin
Cm	Chloramphenicol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanosin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
^{125}J	radioaktives Jodisotop mit der Massenzahl 125
kb	Kilobasenpaare
M	molar
mM	millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
RNS	Ribonukleinsäure
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymidin
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolette Licht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen

EINLEITUNG

Das Postulat der Dichotomie der Organismen, die Einteilung der Lebewesen in Pro- und Eukaryonten, zählte bis vor wenigen Jahren zu den zentralen Aussagen der Biologie.

Die Evolution wurde als ein linearer Vorgang aufgefaßt, der von den Prokaryonten, die als ursprünglicher und primitiver angesehen wurden, zu den komplexeren Eukaryonten führte. Die Prokaryonten waren dabei anfänglich nur im negativen Sinn, durch das Fehlen bestimmter eukaryotischer Eigenschaften, definiert. Ihre Systematik litt im Gegensatz zu derjenigen der Eukaryonten an einem Mangel wohldefinierter taxonomischer Kriterien.

Eine erste Chance diesen Mangel zu beseitigen, ergab die Arbeit von Zuckerkandl und Pauling (1965), die erkannten, daß Sequenzvergleiche von Makromolekülen als molekulare Chronometer dienen können und die damit die Grundlage für eine moderne Taxonomie schufen.

Dieser neue Ansatz bot zur Bestimmung der natürlichen Verwandtschaft der Bakterien entscheidende Vorteile, wurde aber zunächst kaum genutzt.

Mehr als zehn Jahre vergingen, ehe diese Methode in die Systematik der Bakterien Eingang fand; dann allerdings löste sie eine Revolution des Bildes der biologischen Entwicklung aus.

Carl Woese postulierte 1977 aufgrund von Untersuchungen der molekularen Struktur der 16S rRNS die Existenz eines dritten Organismenreiches neben Eukaryonten und Eubakterien: die Archaeobakterien.

Die Eukaryonten erscheinen nun nicht mehr als eine "Fortentwicklung" der Prokaryonten, sondern als gleichwertige monophyletische Entwicklungslinie neben Archae- und Eubakterien.



Archaeobakterien zeichnen sich in Morphologie und Physiologie durch eine Reihe von Besonderheiten gegenüber den anderen Organismenreichen aus:

- Anstelle von Murein werden verschiedene andere Zellwandpolymere gefunden. Vorherrschend ist eine Proteinzellhülle, eine sogenannte S-Layer, die aus Glycoprotein aufgebaut ist (Kandler und König, 1985).
- Die Lipide der Cytoplasmamembran der Archaeobakterien bestehen aus Glycerinäthern mit Isoprenoiduntereinheiten in den Seitenketten (Langworthy et al., 1982).
- Archaeobakterien verfügen über eine Anzahl ungewöhnlicher Coenzyme (Jones et al., 1987).
- Die Zahl ribosomaler Proteine weicht von der in Eubakterien und Eukaryonten ab (Schmid und Böck, 1982).
- Die ribosomale RNS von Archaeobakterien weist in ihrer Sekundärstruktur Merkmale auf, die weder in Eukaryonten noch in Eubakterien vorhanden sind (Fox, 1985).

In vielen Eigenschaften zeigen die Archaeobakterien Mosaikcharakter, weisen also sowohl eubakterielle als auch eukaryotische Merkmale auf. Ein Beispiel ist das Verhalten gegenüber Inhibitoren der Proteinbiosynthese. Archaeobakterien sind wie Eukaryonten sensitiv gegen Diphtherietoxin, nicht jedoch gegen den eukaryotischen Inhibitor Cycloheximid. Auf der anderen Seite sind sie empfindlich für die auf Eubakterien wirkenden Antibiotika Pulvomycin und Thiostrepton, aber resistent gegen Streptomycin (Hummel et al., 1986).

Mit den Eubakterien teilen die Archaeobakterien weiterhin vor allem die prokaryotische Zellorganisation und das Fehlen von Zellkern und Organellen. Die Organisation der rRNS-Gene ist in

beiden Organismenreichen ähnlich (Böck et al., 1986).

"Eukaryotisch" ist dagegen die Existenz von Introns in Genen für stabile RNS (Kaine et al., 1983; Kjems und Garret, 1985; Wich et al., 1987) sowie die Struktur der DNS- abhängigen RNS-Polymerase, die große Ähnlichkeit zum homologen Enzym aus Eukaryonten aufweist (Pühler et al., im Druck).

Makromoleküle, die Untersuchungen auf genotypischer Ebene erlauben sollen, müssen zwei Bedingungen erfüllen:

- 1) Sie müssen universell sein.
- 2) Im Verlauf der Evolution muß ihre Struktur möglichst konserviert geblieben sein.

Diese Anforderungen werden von Komponenten des Translationsapparates ideal erfüllt. Er ist essentiell für alle Zellen und diese Unentbehrlichkeit läßt eine hohe Konserviertheit seiner Bestandteile und seiner Struktur erwarten. Bis heute war es überwiegend die ribosomale RNS, insbesondere die 16S rRNS, Bestandteil der 30S-Untereinheit des Ribosoms, die zu Ähnlichkeitsuntersuchungen herangezogen wurde.

In Abbildung 1 sind die Verwandtschaftsbeziehungen der drei Organismenreiche dargestellt, wie sie von C.R. Woese aufgrund der Analyse von 16S rRNS ermittelt werden konnten. Aus einem gemeinsamen Ursprung lassen sich drei in sich kohärente, monophyletische Entwicklungslinien ableiten: die drei Organismenreiche Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryonten. Alle drei Gruppen haben sich unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt. Die Archaeobakterien zeigen den kürzesten Abstand zum gemeinsamen Verzweigungspunkt, haben sich also am wenigsten von diesem fortentwickelt. Die tiefe Aufspaltung innerhalb der Archaeobakterien trennt Methanogene/Halophile auf der einen von schwefelabhängigen Vertretern auf der anderen Seite.

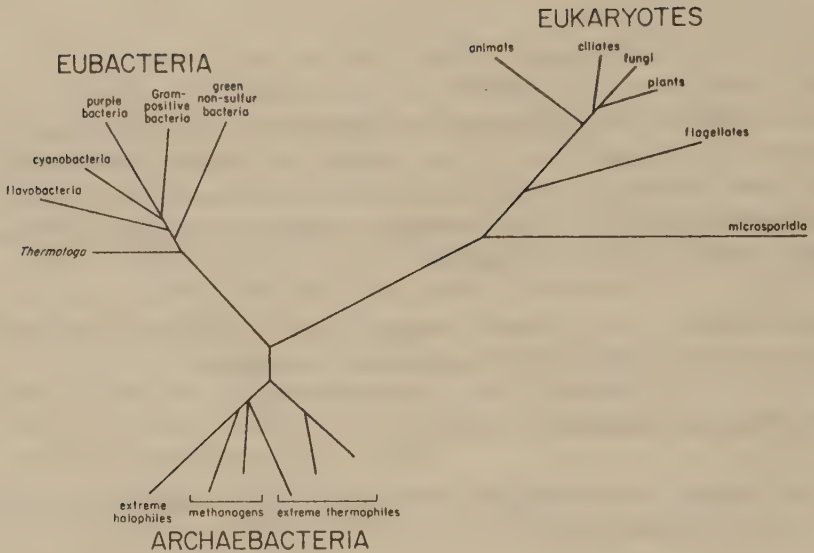


Abbildung 1:

Stammbaum der Organismen, abgeleitet aus Vergleichen der 16S rRNS (Woese, 1987).

Einschränkend muß jedoch angeführt werden, daß der in Abbildung 1 gezeigte, wie auch alle anderen auf dem Vergleich von Makromolekülen basierenden Stammbäume eine wichtige Forderung nicht erfüllt: Er gibt die phylogenetische Distanz der untersuchten Organismen wieder, nicht aber die zeitliche Abfolge, nach der diese Entwicklung erfolgte.

Neben der 16S rRNS kamen auch die RNS-Moleküle der großen ribosomalen Untereinheit, 5S und 23S, bei der Konstruktion von Stammbäumen zur Anwendung.

Die Analyse der 5S rRNS wurde vor allem von Hori und Osawa vorangetrieben. Ein Stammbaum basierend auf 5S rRNS-Sequenzen, dem allerdings aufgrund der Kürze des 5S-Moleküls geringere Signifikanz zuzumessen ist, kommt zu prinzipiell ähnlichen Aus-

sagen, wie sie die Untersuchung der 16S rRNS ergibt (Hori und Osawa, 1987). Ein wesentlicher Unterschied ist jedoch, daß hier Archaeobakterien und Eukaryonten einander näher stehen, während im 16S-Stammbaum die Abzweigung der Archaeobakterien mehr auf Seite der Eubakterien liegt.

Basierend auf Sequenzen der 23S rRNS wurde von Garrett und Mitarbeitern (Leffers et al., 1987) ein Stammbaum entwickelt, der dem von Carl Woese erstellten Dendrogramm der 16S rRNS nahekammt. Der Verzweigungspunkt rückt hier etwas weiter in Richtung Eukaryonten, liegt aber immer noch den Eubakterien näher als den Eukaryonten.

So intensiv die stabile RNS der Archaeobakterien seit dem Postulat des dritten Organismenreiches untersucht worden war, so vernachlässigt blieb zunächst die Analyse von Genen, die für archaeobakterielle Proteine codieren. Dies wird erklärlich, wenn man berücksichtigt, daß die Klonierung solcher Gene einen wesentlich höheren Aufwand erfordert.

Bakteriorhodopsin war das erste archaeobakterielle Protein, dessen Genstruktur aufgeklärt wurde. Die DNS-Sequenz dieses Gens (bop) (Dunn et al., 1981) lieferte den überraschenden Befund, daß die Shine-Dalgarno-Sequenz nicht wie bei Eubakterien üblich vor dem Initiationskodon, sondern dahinter liegen muß.

Die Analyse des bop-Gens und des brp-Gens, eines Regulators von Bakteriorhodopsin (Betlach et al., 1984), gab erste Hinweise auf die Regulation archaeobakterieller Gene.

Gene für Proteine mit einer Funktion im anabolischen Stoffwechsel konnten von Reeve und Mitarbeitern aus verschiedenen methanogenen Archaeobakterien isoliert und charakterisiert werden. Ein Gen aus der Histidinbiosynthese, *hisA*, konnte über Komplementation auxotropher Mutanten aus *Methanococcus* (M.) *vannielii* und *M. voltae* (Cue et al., 1985) sowie aus *M. thermolithotrophicus* (Weil et al., 1987) isoliert werden. In ähnlicher Weise wurde *hisJ*, ebenfalls ein Gen der Histidinbiosynthese, aus *M. vannielii* erhalten (Beckler und Reeve, 1986). Dieses Gen zeigt wie die

archaebakterielle 5S rRNS höhere Ähnlichkeit zu entsprechenden Genen aus Eukaryonten als aus Eubakterien.

Von der gleichen Arbeitsgruppe konnte auch das *purE* (*E. coli*) komplementierende Gen aus *Methanobacterium* (Mb.) *thermoautotrophicum* und *Methanobrevibacter smithii* (Hamilton und Reeve, 1985) analysiert werden. Weiterhin existieren Sequenzanalysen der Gene für die Formiatdehydrogenase aus Mb. *formicicum* (Shuber et al., 1986) und für die Methyl-CoM-Reduktase aus Mb. *thermoautotrophicum* (Bokranz et al., 1988).

Von den Genen, die an grundlegenden Stoffwechselaktivitäten beteiligt und damit als molekulare Chronometer geeignet sind, wurden bislang nur diejenigen der DNS-abhängigen RNS-Polymerasen eingehend untersucht (Pühler et al., im Druck). Sie zeigen in ihrer Sequenz wesentlich höhere Ähnlichkeit zu denjenigen aus Eukaryonten als zu denen aus Eubakterien.

Von einigen ribosomalen Proteinen aus Archaeobakterien liegen Aminosäuresequenzen vor. Die ribosomalen Proteine S6, S12, S14, S15 und S16 aus *Halobacterium marismortui* (Kimura et al., 1987, Kimura und Kimura 1987) wurden sequenziert, wobei für das ribosomale Protein S16 gezeigt wurde, daß es Ähnlichkeit zum Äquivalent aus Eukaryonten aufweist. Auch für das A-Protein aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Matheson et al., 1988) und *M. vanniellii* (Strobel et al., im Druck) liegen mittlerweile Sequenzdaten vor, die in die gleiche Richtung weisen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten keine genetischen Untersuchungen über den Proteinanteil des archaebakteriellen Translationsapparates, also über ribosomale Proteine und lösliche Faktoren. Weder über die Struktur noch über die Organisation der entsprechenden Gene lagen Informationen vor.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es daher, Gene für Elongationsfaktoren und ribosomale Proteine von *Methanococcus vanniellii*, einem Repräsentanten des methanogenen Astes der Archaeobakterien, zu analysieren.

Dieser Ansatz sollte die Möglichkeit bieten:

- Proteinmoleküle aus Archaeobakterien als molekulare Chronometer einzusetzen und die erhaltenen Daten mit denjenigen aus Untersuchungen der rRNS zu vergleichen;
- Dem Einfluss von Inhibitoren der Translation auf molekularer Ebene nahezukommen;
- Informationen über regulatorische Prinzipien der Expression von Genen in Archaeobakterien zu gewinnen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Die verwendeten Organismen und deren Herkunft sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für Stämme von *Escherichia coli* ist auch der Genotyp angegeben. Im Verlauf der Arbeit eingesetzte Bakteriophagen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Plasmidvektoren und rekombinante Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 1: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft/ Referenz
Halobacterium (H.) halobium		DSM 670
Methanococcus (M.) vannielii		DSM 1224
Thermoproteus (T.) tenax (DSM 2078)		Zellen erhalten von W. Zillig, Martinsried
Saccharomyces (S.) cerevisiae	MATa his3- Δ 1 leu2-3 leu2-112 ura3 trp1 (rho+)	ATCC 44774

Organismus	Genotyp	Herkunft/Referenz
Stämme von <i>Escherichia</i> (E.) coli K 12:		
E. coli Δ M15	(pro-lac) Δ thi lacZ Δ M15 ara sbrA recA	Rüther et al. (1981)
E. coli RRI Δ M15	lacI ^q Z Δ M15 F' proA ⁺ B ⁺	Rüther (1982)
E. coli 490A	hsdS met thi leu lac recA	Landsmann et al. (1982)
E. coli Y1088	supE supF metB trpR hsdR hsdM tonA21 strA lacU169 proC::Tn5 (pMC 9)	Young u. Davis (1983)
E. coli Y1090	Δ lacU169 proA ⁺ Δ lon araD139 strA supF (trpC22::Tn10) (pMC 9)	Young u. Davis (1983)
E. coli JM101	F' traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15/ Δ (pro-lac) thi supE	Yanisch-Perron et al. (1985)
E. coli JM109	F' traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15/ Δ (pro-lac) recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1	Yanisch-Perron et al. (1985)
E. coli WA321	F- thi-1 thr-1 leuB6 proA2 his-4 argE3 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 dam-4 rpsL31 supE44	Dreiseikelman et al. (1979)
JFM 1	Y1088 recBC	J. Auer

Tabelle 2: Bakteriophagen

Phage	Genotyp	Referenz
Vektoren:		
λ Charon 4A	Aam32 Bam1 lac5 bio256 KH54 BW1 nin5 QSR80	Williams und Blattner (1979)
λ Charon 16	lac5 b1007 BW3 imm80 KH53 BW2 nin5 sHindIII6 DK1	Williams und Blattner (1979)
M 13 mp18	lac'IPOZ'	Yanisch-Perron et al. (1985)

rekombinante Bakteriophagen:

M 13 mp18 a,b	enthalten 1.6 kb EcoRI-Fragment aus pTU66 in beiden Orientierungen	diese Arbeit
M 13 mp18 c,d	enthalten 1.3 kb EcoRI-Fragment aus pTU66 in beiden Orientierungen	diese Arbeit
M 13 mp18 e,f	enthalten 0.65 kb EcoRI-Fragment aus pTU66 in beiden Orientierungen	diese Arbeit

Phage	Genotyp	Referenz
M 13 mp18 g,h	enthalten 1.9 kb EcoRI-Fragment aus pTU66 in beiden Orientierungen	diese Arbeit
M 13 mp18 i	enthält 1.2 kb HindIII-Fragment aus pS12	diese Arbeit

Tabelle 3: Plasmide

a) Vektorplasmide

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Referenz
pBR 322	4.4	Ap ^r Tc ^r	Bolivar et al., (1977)
pACYC 184	4.0	Cm ^r Tc ^r	Chang u. Cohen, (1978)
pUC 18	2.7	Ap ^r lacI ^q	Yanisch-Perron et al., (1985)
pUC 19	2.7	Ap ^r lacI ^q	Yanisch-Perron et al., (1985)
pHC 79	6.4	Ap ^r Tc ^r	Hohn u. Collins, (1980)
pAAH 5	12.5	Ap ^r leu2 2µm	Ammerer, (1983)

b) Rekombinante Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	maßgebliche Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pGA 180	7.1	Cm ^r tufB	An u. Friesen (1980)
pTU 6	4.5	enthält 1.8 kb EcoRI-Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom mit Gen für EF-1 α	Lechner und Böck, (1987)
pTU 66	9.4	enthält 6.6 kb HindIII- Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom mit Genen für EF-2 und EF-1 α	diese Arbeit
pmV S7	5.5	enthält 2.7 kb SacI-Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom mit Gen für das ribosomale Protein S7	diese Arbeit
pmV S12	3.9	enthält 1.2 kb HindIII- Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom mit Gen für das ribosomale Protein S12	diese Arbeit
pmV Hpa	4.5	enthält 1.8 kb HpaI-Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom	diese Arbeit
pmV Hpa19	4.5	enthält 1.8 kb HpaI-Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom	diese Arbeit
pmV 4	6.7	enthält 4.0 kb EcoRI-Fragment aus dem <i>M. vanielii</i> Genom	diese Arbeit

II. Medien

1. Methanococcus-Medium (Douglas et al., 1980)

Zur Anzucht von *M. vannielii* wurde das folgende Medium verwendet
(Angaben pro l):

KH ₂ PO ₄	0.5	g
MgSO ₄	0.4	g
NaCl	18	g
NH ₄ Cl	0.4	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.002	g
Hefeextrakt (Oxoid)	1.0	g
Bacto-Casitone (Difco)	2.0	g
Natriumacetat	1.0	g
Spurenelementlösung SL 6 (DSM Katalog 1977, S. 240)	6	ml
Vitaminlösung nach Wolin et al. (1963)	10	ml
NaHCO ₃	5	g
NiCl ₂	0.0012	g
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0.00035	g
Resazurin	0.1	g
Na ₂ S	0.5	g
Cysteinhydrochlorid	0.5	g

Vor Zugabe von NaHCO₃, Cysteinhydrochlorid und Na₂S wurde der pH-Wert des Mediums auf 6.8 eingestellt. Bebrütet wurde unter einer Gasatmosphäre von 80% H₂ und 20% CO₂. Anzuchten im Fermenter (Braun Melsungen U50B) erfolgten mit 15g/l Formiat im Medium unter einer Gasatmosphäre von 100% N₂.

2. Halobacterium-Medium (Hummel u. Böck, 1987)

Halobacterium wurde im folgenden Medium angezogen (Angaben pro l):

NaCl	200.0	g
MgSO ₄	20.0	g
KCl	5.0	g
CaCl ₂	0.2	g
Trypton (Oxoid)	5.0	g
Hefeextrakt (Oxoid)	3.0	g

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium Tris/HCl pH 7.0 bis zu einer Endkonzentration von 10 mmol/l steril zugesetzt.

3. Hefe-Selektivmedium

Die Anzucht von *S. cerevisiae* fand im folgenden Medium statt (Angaben pro l):

Difco Yeast Nitrogen Base	7 g
Glucose	30 g

Aminosäuren wurden in einer Endkonzentration von 20 µg pro ml supplementiert.

4. Luria-Bertani-Medium (LB; Miller, 1972)

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde in LB-Medium durchgeführt (Angaben pro l):

Trypton (Oxoid)	10 g
Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
NaCl	5 g

5. Trypton Broth (TB; Silhavy et al., 1984)

Die Präparation von λ -Lysaten erfolgte in TB-Medium (Angaben pro l):

Trypton	10 g
NaCl	5 g

Nach dem Autoklavieren wurden 0.2% Maltose und 2.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt.

6. Werkmann-Minimalmedium (WM; Fraenkel u. Neidhard, 1961)

Neben LB wurde für die Anzucht von E. coli Stämmen WM-Minimalmedium verwendet (Angaben pro l):

KH_2PO_4	13.6	g
Na_2HPO_4	8.9	g
MgSO_4	0.25	g
CaCl_2	0.0015	g
Glucose	4.0	g

Feste Nährmedien enthielten 1.5% Agar oder 0.65% Agar (Weichagar).

Dem WM-Medium wurden Supplemente nach dem Autoklavieren in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Aminosäuren	40 mg/l
Vitamin B1	5 mg/l

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben (Angaben pro l):

Ampicillin	50 mg bzw. 100 mg
Chloramphenicol	70 mg
Spectinomycin	300 mg
Tetracyclin	15 mg

III. Aufbewahrung von Kulturen und Anzuchtbedingungen

1. Aufbewahrung von Kulturen

Kulturen von *M. vannielii* wurden in 14-tägigem Zyklus in frisches Medium überimpft.

Kulturen von *E. coli* wurden in Glycerinlösung (45%) bei -20°C aufbewahrt.

M 13-Phagen wurden nach Inkubation der Phagen enthaltenden Kulturüberstände für 5 min bei 65° C ebenfalls bei 4° C gelagert.

2. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *M. vannielii* erfolgte bei 37°C in Serumflaschen (Machery & Nagel). Diese wurden mit je 20 ml Methanococcus-Medium (ohne Cysteinhydrochlorid und Na₂S) gefüllt, gasdicht verschlossen, danach dreimal evakuiert und mit dem entsprechenden Gasgemisch begast (1 bar Überdruck). Anschließend wurden die Gefäße autoklaviert. Mit Na₂S und Cysteinhydrochlorid reduziert wurde das Medium erst kurz vor der Inokulation. Großanzuchten wurden unter N₂-Atmosphäre in einem 50 l Fermenter (Braun Melsungen Biostat U 50 D) durchgeführt.

H. halobium und *E. coli* Stämme wurden bei 37°C in Wasserbad-schüttlern (New Brunswick G 76) oder auf Rundschüttlern (Braun Melsungen TR1) in einem auf 37°C temperierten Brutraum angezogen.

IV. Vermehrung von Bakteriophagen

Die Anzucht von λ-Phagen mit den *E. coli* Stämmen Y1088 und Y1090 erfolgte wie bei Silhavy et al. (1984), die Titerung wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben. Zur Reinigung der Bakteriophagen wurden CsCl-Blockgradienten angewendet (Davis et al., 1980).

M 13-Phagen wurden nach der Methode von Messing (1983) vermehrt, wobei die *E. coli* Stämme JM 101 und JM 109 Verwendung fanden.

V. Immunologische Methoden

1. Präparation von Antiserum

Kaninchen wurden mit gereinigtem EF-1 α -Protein aus *M. vanthielii* immunisiert, das freundlicherweise von F. Klink (Kiel) zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden 50 μ g EF-1 α in Suspension mit komplettem Freund'schem Adjuvans im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und subcutan injiziert. Weitere Injektionen erfolgten 22 Tage bzw. 29 Tage nach der ersten Injektion mit je 100 μ g EF-1 α in inkomplettem Freund'schem Adjuvans. Die Blutabnahme erfolgte 38 Tage nach der ersten Injektion aus der Ohrvene.

Rohserum wurde nach der von Piepersberg et al. (1975) beschriebenen Methode gewonnen. Die IgG-Fraktion wurde aus dem Rohserum mittels Ammonsulfatfällung und anschließender Ionenaustauschchromatographie auf DE 52 (Whatman) isoliert (Garvey et al., 1977). Immunglobulin G läuft hierbei im Ausschlussvolumen.

2. Immunoblot-Experimente

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 12.5 % SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (1970). Anschließend wurden die Proteine in einer Blotkammer (Bio Rad) elektrophoretisch (70V, 2h) auf Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll) übertragen (Towbin et al., 1979). Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 19.2 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol. Zur Überprüfung des Protein-Transfers wurden die Nitrocellulosefilter 10-20 min mit Amidoschwarz gefärbt (0.1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure) und danach wieder entfärbt (90 % Methanol, 2 % Essigsäure).

Die Inkubationsbedingungen für die Antikörperbehandlung folgten im wesentlichen der Methode von Young und Davis (1983). Die Filter wurden nach dem Entfärben zweimal kurz in H₂O gespült und mit 0.6 % Magermilchpulver in TBS-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0; 150 mM NaCl) 1 h bei 37°C abgesättigt. Nach zweimaliger Waschung mit

TBS-Puffer wurde Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:400 in TBS-Puffer zugegeben. Nach 2-16 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Filter fünfmal mit TBS-Puffer gewaschen und in 20 ml des obigen Puffers mit 0.6 % Milchpulver und 2.5 μCi ^{125}I markiertem Protein A weitere drei Stunden inkubiert. Danach wurden die Filter 5 min in TBS, 5 min in TBS mit 0.1 % NP40 und nochmals 5 min in TBS gewaschen, anschließend getrocknet und autoradiographiert.

VI. Peptidsequenzierung

Die Abfolge der Aminosäuren am N-Terminus des EF-1 α wurden mit der Peptidsequenzierungsmethode nach Wittmann-Liebold und Kimura (1984) untersucht. Als Kontrolle wurde das Peptid Bradykinin mitgeführt. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidfolien (Schleicher & Schüll).

VII. Molekulargenetische Methoden

1. Isolierung von DNS

Chromosomale DNS wurde in der von Marmur (1961) beschriebenen Weise isoliert.

Die Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNS (bis 20 μg) aus E. coli erfolgte mit der Methode von Birnboim u. Doly (1979). Plasmid-Schnellpräparationen, die für die DNS-Sequenzierung Verwendung fanden, wurden modifiziert nach Chen u. Seeburg (1985) gewonnen. Zur Plasmidpräparation im größeren Maßstab wurden die entsprechenden E. coli Stämme in LB-Medium bis zu einer OD_{420} von 1.0 angezogen. Dann wurden 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol (bei Ampicillin-resistenten Stämmen), bzw. 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Spectinomycin (bei Chloramphenicol-resistenten Stämmen) zugesetzt und für weitere 5-12 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte über alkalische Lyse nach Birnboim u. Doly (1979) mit Modifikationen

nach Maniatis et al. (1982). Nicht-methylierte Plasmid-DNS wurde aus dem dam-Methylase negativen Stamm WA 321 isoliert.

Einzelsträngige DNS aus M13 Phagen wurde nach der von Messing (1983) beschriebenen Methode gewonnen. Die doppelsträngige Form der Phagen-DNS wurde in der gleichen Weise wie bei Plasmid-Schnellpräparationen erhalten. λ -DNS wurde aus den gereinigten Phagenpartikeln nach Silhavy et al. (1984) präpariert.

2. Isolierung von RNS

Aus *E. coli* JM 109 und *M. vanniellii* wurde RNS nach der von Beauclerk et al. (1985) beschriebenen Methode isoliert.

3. In vitro Rekombination von DNS

a) Spaltung von DNS mit Restriktionsendonucleasen

Spaltung von doppelsträngiger DNS wurde mit Restriktionsendonucleasen entweder in Tris-Acetat-Puffer (33 mM Tris-Acetat pH 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0.5 mM Dithiothreitol, 0.01 % RSA, O'Farrell et al., 1980), oder in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer-System durchgeführt.

b) Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in horizontalen 0.4-1.5 %-igen Agarosegelen bei 5-10 V/cm. Als Gel- und Laufpuffer diente 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.3 (TBE-Puffer) nach Peacock und Dingmann (1969). Zum Auftrag wurde den Proben "Agarosebeads" nach Schaffner et al. (1976) zugesetzt. Zur "Anfärbung" der DNS wurde den Gelen 0.1 μ g Äthidiumbromid pro ml zugegeben. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) konnte das an die DNS angebundene Äthidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden hauptsächlich zwei Methoden verwendet:

- a) Aus einer DEAE-Membran (NA 45 Schleicher & Schüll) wurden Streifen von ca. 1 cm Breite ausgeschnitten. Diese wurden 10 Minuten in 10 mM EDTA pH 7.6, dann 5 min in 0.5 M NaOH gespült, anschließend mehrmals in H₂O gewaschen und bei 4°C aufbewahrt (Dretzen et al., 1981). Die Elektrophorese wurde mit normalen Agarosegelen durchgeführt. Unterhalb der zu isolierenden DNS wurden in den Gelen Schnitte senkrecht zur Richtung des elektrischen Feldes angebracht und die vorbereiteten Streifen der DEAE-Membran eingesteckt. Hierauf wurde erneut Spannung angelegt, so daß die gewünschten DNS-Fragmente zur DEAE-Membran wanderten und dort gebunden wurden. Die DEAE-Streifen wurden entnommen und mit 250 µl Hochsalz-Puffer (NET, 1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8) für 10-45 min bei 68°C inkubiert. Dadurch wurden ca. 90 % der DNS wieder freigesetzt. Der Puffer wurde abgehoben und die DNS mit Äthanol ausgefällt.

- β) Zur Herstellung der Agarosegele, aus denen anschließend DNS-Fragmente isoliert werden sollten, wurde "low gelling temperature"- Agarose (Sigma, Typ VII) verwendet. Die Gele wurden bei 4°C gegossen, ansonsten wurde bei der Herstellung wie üblich verfahren. Nach der Elektrophorese wurden die Gelstückchen mit den gewünschten DNS-Fragmenten ausgeschnitten, mit 1 Vol. sterilem H₂O versetzt und bei 68°C für 15 min aufgeschmolzen. Die Lösung wurde anschließend mit 200 µl Phenol (0.1 % Hydroxychinolin, äquilibriert mit 0.1 M Tris/Cl pH 7.6) intensiv vermischt und für 3 min bei 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und schließlich mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNS wurde mit Äthanol in Gegenwart von 0.3 M Na-Acetat gefällt, danach mit 70 %-igem Äthanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

In einigen Fällen wurden DNS-Fragmente nach der von Benson (1984) beschriebenen Methode isoliert.

c) Behandlung von DNS-Fragmenten zur Erzeugung stumpfer Enden

3'-überhängende Enden von DNS-Fragmenten wurden mit Hilfe von Nuclease S1 abgebaut (Maniatis et al., 1982). Fragmente mit 5'-überhängenden Enden wurden mit dem sog. Klenow-Fragment der DNS-Polymerase von E.coli behandelt. Als Substrat für die DNS-Polymerase dienten Desoxyribonucleotid-Triphosphate (Maniatis et al., 1982).

d) Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten erfolgte mit T4-DNS-Ligase in 20 mM Tris/Cl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0.6 mM ATP. Fragmente mit stumpfen Enden wurden 6 h bei 22°C, Fragmente mit kohäsiven Enden 16 h bei 16°C mit DNS-Ligase inkubiert. Vektor-DNS und Spender-DNS wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Um eine Rezirkularisierung der Vektor-Fragmente zu vermeiden, wurden diese vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Ullrich et al., 1977). Synthetische Linkermoleküle wurden, nach Phosphorylierung der 5'-Enden mit T4-Polynucleotid-Kinase, mit T4-DNS-Ligase an DNS-Fragmente mit stumpfen Enden gekoppelt (Maniatis et al., 1982).

4. Transformation und Transfektion von E. coli-Zellen

Transformation von E. coli-Zellen mit Plasmid-DNS wurde nach Cohen et al. (1972) durchgeführt. Transfektion kompetenter Zellen mit doppelsträngiger DNS des Bakteriophagen M13 erfolgte nach Messing (1983).

5. Verpackung von Cosmid- bzw. λ -DNS

Zur in vitro Verpackung von neukombinierter Cosmid- bzw. λ -DNS wurden käufliche Verpackungsextrakte (Boehringer Mannheim) herangezogen. Die Verpackung wurde nach der Vorschrift von Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

6. Markierung von DNS mit ^{32}P -Phosphat

a) Endmarkierung von DNS-Fragmenten

Fragmente mit 5'-überhängenden Enden wurden, nach Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe durch alkalische Phosphatase, mittels T4-Polynucleotid-Kinase mit γ - ^{32}P -ATP markiert (Maxam u. Gilbert, 1980). Die Markierung von DNS-Fragmenten mit 3'-rückstehenden Enden wurde durch Auffüllen mit einem α - ^{32}P -dNTP und unmarkierten dNTPs unter Einsatz des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I von E. coli erreicht.

b) "Nick-Translation"

DNS-Fragmente, die für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden sollten, wurden durch E. coli DNS-Polymerase I (Holoenzym) unter Verwendung eines α - ^{32}P -dNTPs und unmarkierter dNTPs markiert (Maniatis et al., 1982). Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Gelfiltration an einem Sephadex 50 G (Whatman)-Säulchen abgetrennt.

7. Hybridisierungsexperimente

a) DNS/DNS-Hybridisierungen

Nach Spaltung mit Restriktionsendonucleasen wurden die erhaltenen DNS-Fragmente in Agarosegelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll) übertragen. Dazu wurde entweder die Methode nach Southern (1975) angewendet, oder diese wie folgt modifiziert (E. M. Geigl, persönliche

Mitteilung):

Anstelle des von Southern beschriebenen Transferpuffers wurde ein Puffer mit 1 M NH_4 -Acetat, 0.02 M NaOH verwendet und das Gel für 30 min in diesem Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel ohne zusätzlichen Puffer in einer Wanne mit einem Nitrocellulosefilter, darüber 2 Lagen Filterpapier (3MM Whatman) und einer ca. 5 cm dicken Lage von saugfähigem Papier bedeckt. Der Papierstapel wurde mit einem Gewicht von 0.5 kg belastet. Der Transfer der DNS auf den Nitrocellulosefilter benötigte 6-8 h. Zur Hybridisierung mit markierten DNS-Fragmenten wurden die Filter bei 65°C für homologe, bzw. bei 55° C für heterologe Hybridisierungen in 6X SSPE (0.9 M NaCl, 0.02 M NaH_2PO_4 , 6 mM EDTA, pH 7.4) mit 0.7 % Magermilchpulver (Johnson et al., 1984) inkubiert. Die Filter wurden in 2xSSPE (0.3 M NaCl, 0.02 M NaH_2PO_4 , 6 mM EDTA, pH 7.4) mit 0.1 % SDS gewaschen und mit einem Röntgenfilm exponiert.

b) DNS/RNS-Hybridisierungen

Frisch präparierte Gesamt-RNS wurde für DNS/RNS-Hybridisierungen auf 1.2 %igen Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen (6 % Formaldehyd im Gel) aufgetrennt (Lehrach et al., 1977). Die Elektrophorese erfolgte in einem Puffer mit 20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM Na_2EDTA , pH 7.0 bei 150 V. Die RNS wurde anschließend mittels eines Transferpuffers (25 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , pH 7.5) auf Nylonmembranen (Gene Screen, NEN) übertragen. Die Membranen wurden in einem Puffer mit 50 % entionisiertem Formamid, 0.2 % Polyvinyl-Pyrrolidon, 0.2 % Rinderserumalbumin, 0.2 % Ficoll, 0.05 M Tris/Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 0.1 % Na-Pyrophosphat, 1 % SDS, 10 % Dextran-sulfat, 100 µg/ml Lachssperm-DNS bei 40°C für 6 h prähybridisiert. Nach Zugabe markierter DNS-Fragmente wurde für 20 h hybridisiert. Daran schlossen sich folgende Waschschrte an : Zweimal 5 min in 2xSSPE bei Raumtemperatur, zweimal 30 min bei 65°C in 2xSSPE 0.1 % SDS, zweimal 30 min bei Raumtemperatur in 0.1xSSPE.

8. Verkürzung von DNS-Fragmenten mittels Exonuclease III

Plasmid-DNS bzw. doppelsträngige DNS von M13-Klonen wurde mit zwei Restriktionsendonucleasen gespalten, von denen die eine 5'-überhängende Enden, die andere 3'-überhängende Enden erzeugte. Die erhaltenen Fragmente wurden durch Behandlung mit Exonuclease III verkürzt, wobei nach dem Protokoll von Henikoff (1984) vorgegangen wurde. Aus den Reaktionsansätzen wurden in Abständen von 20-30 sec Aliquots entnommen und die Reaktion mit je 30 µl 0.5 M Tris/Cl, pH 8.0, 0.125 M EDTA beendet. Die Proben wurden anschließend 30 Minuten lang mit Nuclease S1 (200U/ml) behandelt, um den durch die Exonuclease III entstandenen 5'-Überhang der DNS abzubauen. Nach Phenolextraktion der DNS wurden mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNS-Polymerase und dNTPs stumpfe Enden erzeugt und die DNS mit T4-DNS-Ligase rezirkularisiert. Nach Transformation bzw. Transfektion in E. coli JM 109 wurde die Größe der Deletionen über Plasmid-Schnellpräparationen ermittelt.

9. DNS-Sequenzierung

a) basenspezifische Sequenzreaktionen

α) nach Maxam und Gilbert (1980)

Zur Sequenzierung von DNS mit Hilfe der chemischen Spaltung wurde Plasmid-DNS (jeweils ca. 20 µg) mit einer Restriktionsendonuclease gespalten, die 5'-überhängende Enden erzeugt. Die erhaltenen Fragmente wurden am 5'- oder 3'-Ende mit ^{32}P -ATP markiert und mit einer geeigneten zweiten Restriktionsendonuclease so nachgespalten, daß die entstehenden Fragmente nur an einem Molekülende markiert waren. Das zu sequenzierende Fragment wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem "low gelling Agarose"-Gel eluiert und extrahiert. Die basenspezifischen Sequenzreaktionen wurden dann nach dem von Maxam und Gilbert (1980) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

β) nach Sanger

Alternativ zur Methode von Maxam und Gilbert wurde die Sequenzierung mit der Didesoxynucleotid-Methode nach Sanger (1977) ausgeführt. Hierfür wurde sowohl Plasmid-DNS als auch M13 Doppelstrang-DNS eingesetzt. Als Primer-Moleküle dienten synthetische Oligonukleotide (Universal- und Reversprimer, Boehringer Mannheim). Die Markierung erfolgte mit α - ^{32}S -ATP.

b) Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der DNS-Fragmente nach den Sequenzreaktionen erfolgte nach Denaturierung der DNS auf 6 %, 8 % und 20 % Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff, oder auf 6.6 % Polyacrylamidgelen mit einem kontinuierlichen Salzgradienten (Schnier, persönliche Mitteilung). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 1 Stunde bei 80°C getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

c) Computeranalyse

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit drei Computersystemen. Zunächst wurden die ermittelten Einzelsequenzen in einem Apple-IIe-Microcomputer mit Hilfe des Programmes "Sequence Analysis" Version 3.0 von Larson und Messing (1983) gespeichert und verarbeitet. Weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe eines IBM-AT-Computers und des Programmes "PC Gene" Version 5.10. Für den Vergleich von Proteinsequenzen wurde eine Microvax A mit einem UWGCG-Programmpaket eingesetzt.

10. Bestimmung von Transkriptionssignalen mit Nuclease S1

a) Bestimmung der Transkriptionsstartstelle

Die Ermittlung der Initiationsstelle der Transkription erfolgte in der von Wich et al. (1986) beschriebenen Weise. Dazu wurden 100 µg Gesamt-RNS mit 1 µg des entsprechenden DNS-

Fragmentes versetzt, das am 5'-Ende markiert worden war. Nach Präzipitation mit Äthanol wurde das DNS/RNS-Gemisch durch Aufziehen mit einer Kolbenhubpipette in 30 µl des folgenden Puffers gelöst: 40 mM Pipes, 80 % Formamid, 0.4 M NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.4 (Schenk et al., 1975). Die Ansätze wurden bei 85°C denaturiert und anschließend 3 h hybridisiert (Weaver und Weissmann, 1979). Die Hybridisierung erfolgte bei der nach Casey und Davidson (1977) berechneten DNS/RNS-Hybridisierungstemperatur oder 3,5°C über bzw. unter dieser Temperatur. Nach der Hybridisierung wurden die Ansätze durch Zugabe des 10-fachen Volumens S1-Puffer (5 mM Na-Formiat, 280 mM NaCl, 4.5 mM ZnSO₄, pH 4.6; 20 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNS) verdünnt, der Nuclease S1 in einer Endkonzentration von 1000 U/ml enthielt (Berk und Sharp, 1977). Nach 30 Minuten Inkubation bei 30°C wurde die Enzymreaktion mit EDTA (2 mM Endkonzentration) beendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Isopropanol ausgefällt und auf einem 6 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein Sequenzansatz des entsprechenden, 5'-markierten DNS-Fragmentes verwendet.

b) Bestimmung der Transkriptionsterminationsstelle

Wie unter a) beschrieben erfolgte auch die Ermittlung der Terminationsstelle der Transkription. Jedoch wurde hierfür das entsprechende, am 3'-Ende markierte DNS-Fragment benutzt. Zur Auftrennung der Reaktionsprodukte diente ein 8 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff.

VIII. Ansatz zur ADP-Ribosylierung von EF-2

Hefezellen wurden in Minimalmedium bis zu einer OD₄₂₀ von 0.5 angezogen. 30 ml Kultur wurden dann zentrifugiert und der Niederschlag in 2 ml Puffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 2 mM Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zwei

Passagen in der French-Press bei 20000 Psi unterworfen. Für die ADP-Ribosylierung wurden 80 µl Zellrohextrakt mit 2 µCi ^{32}P -NAD und 1-10 µg Diphtherietoxin pro Ansatz in einem Endvolumen von 100 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend sofort mit Auftragspuffer (Laemmli) versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (7 % Acrylamid) aufgebracht.

IX. Enzyme und Chemikalien

Restriktionsendonucleasen wurden von Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach) oder BRL (Neu-Isenburg) bezogen. Das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, T4-DNS-Ligase, alkalische Phosphatase und Polynucleotidkinase stammten von Boehringer (Mannheim).

^{125}I -Protein A, ^{35}S -ATP, ^{32}P -NAD, α - ^{32}P -ATP und γ - ^{32}P -ATP wurden von NEN (Dreieich) oder Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert. Phenol wurde durch Destillation gereinigt, mit 0.1 % Hydroxychinolin versetzt und mit 0.1 M Tris/Cl, pH 8.0 gesättigt.

Sephadex 50 G war von Pharmacia (Freiburg), DE 52-Cellulose von Whatman Biochemicals (Maidstone).

Diphtherietoxin stammte von Calbiochem (Frankfurt).

Feinchemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

C. ERGEBNISSE

I. Klonierung des Gens für EF-1 α aus *Methanococcus vannielii*

Als Untersuchungsobjekt für die Beantwortung der in der Einleitung genannten Fragestellungen bot sich das für den Elongationsfaktor 1 α (in Eubakterien EF-Tu) kodierende Gen an.

Einerseits ließ dessen Zugehörigkeit zum Translationsapparat eine hohe Konservierung seiner Struktur erwarten, andererseits lagen für dieses Protein bereits eine Reihe von Sequenzdaten aus Eubakterien und Eukaryonten vor, was vergleichende Untersuchungen möglich machte. Gereinigter EF-1 α aus *Methanococcus* wurde von F.Klink (Kiel) zur Verfügung gestellt. Damit war weiterhin die Möglichkeit gegeben, Antikörper gegen EF-1 α zu erzeugen und anschließend λ -Genbanken auf die Expression des EF-1 α Gens abzusuchen.

Von W. Ludwig (München) konnte das von An und Friesen (1980) konstruierte Plasmid pGA 180 erhalten werden. Dieses Plasmid trägt das *tufB* Gen aus *E. coli*, das über heterologe Hybridisierung zur Suche nach dem *M. vannielii* EF-1 α Gen herangezogen werden konnte.

1. Heterologe Hybridisierung

a) Heterologe Hybridisierung von *M. vannielii* DNS mit *E.coli* *tufB*-DNS

Um zu untersuchen, ob sich das *E. coli* *tufB* Gen als Hybridisierungssonde zur Klonierung des *M. vannielii* EF-1 α eignet wurde das Plasmid pGA 180 mit den Restriktionsendonucleasen PstI und ClaI abgebaut. Die DNS-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in low gelling Agarose aufgetrennt und ein 1.5 kb großes ClaI-PstI-Fragment eluiert, welches das *E. coli* *tufB* Gen vollständig enthält. Dieses Fragment wurde anschließend über Re-Elektrophorese von Verunreinigungen durch

andere DNS-Fragmente gereinigt. Die erhaltene DNS wurde dann mittels Nick-Translation radioaktiv markiert. Aus *M. vannielii* DSM 1224 wurde parallel dazu chromosomale DNS isoliert. Davon wurden je 15 µg mit den Restriktionsendonucleasen Eco RI bzw. HindIII gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt. Die chromosomale DNS wurde danach auf einen Nitrocellulosefilter übertragen und mit dem nick-translatierten *E. coli* *tufB* Fragment unter heterologen Bedingungen hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung zeigt Abbildung 2. Mit HindIII gespaltene DNS aus *M. vannielii* lieferte ein Hybridisierungssignal bei 6.6 kb, mit EcoRI gespaltene DNS ein Signal bei 1.8 kb. Die geringe Intensität des Signals (Exponierdauer 9 Tage) ist angesichts des großen Unterschiedes im GC-Gehalt und in der phylogenetischen Distanz der beiden Organismen nicht ungewöhnlich. Das Auftreten jeweils nur eines Hybridisierungssignals deutet darauf hin, daß in beiden Fällen das Gen für EF-1 α vollständig in den hybridisierenden DNS-Fragmenten enthalten ist.

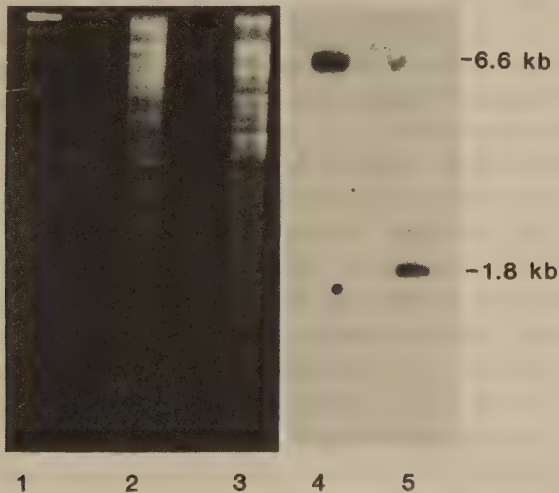


Abbildung 2:

Agarosegelelektrophorese von Eco RI (Spur 2) bzw. HindIII (Spur 3)- gespalte-
ner *M. vannielii* DNS. Daneben die entsprechende Autoradiographie der Hybridi-

sierung mit der *E. coli* *tufB*-Probe (Spuren 4 und 5) nach 9 Tagen Exponierung. Spur 1 enthält λ -DNS mit HindIII gespalten als Längenstandard. Die Größe der hybridisierenden Fragmente ist in kb angegeben.

b) Versuch der Klonierung des *Methanococcus* EF-1 α Gens in verschiedene Plasmide

Nachdem nun bekannt war, daß DNS aus *Methanococcus* mit *tufB* aus *E. coli* hybridisiert, wurden die oben beschriebenen Fragmente in Plasmide kloniert und die erhaltenen Klone mittels heterologer Hybridierung nach dem *tuf* Gen aus *M. vannielii* abgesucht. Dazu wurde chromosomale DNS von *M. vannielii* mit Eco RI bzw. HindIII abgebaut. Eco RI-Fragmente von 1.8 kb bzw. HindIII-Fragmente von 6.6 kb Größe wurden isoliert und diese Fragmente dann in die entsprechenden Restriktionspaltstellen des Plasmids von pUC 19 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* RRI Δ M15 wurden Klone, die auf IPTG/X-Gal-Platten (Yanisch-Perron et al., 1985) farblos blieben, isoliert und in einer Koloniehybridisierung eingesetzt. Als Hybridisierungssonde diente das unter (a) beschriebene DNS-Fragment aus dem Plasmid pGA 180, welches das *tufB* Gen aus *E. coli* trägt.

Aus 800 untersuchten Klonen konnte jedoch kein positiver Klon isoliert werden. Gleiche Ansätze mit dem Vektorplasmid pBR 322 anstelle von pUC 19 verliefen ebenfalls ergebnislos. Dieser Befund führte zu der Spekulation, daß möglicherweise das klonierte *M. vannielii* EF-1 α Gen über Zufallspromotoren in *E. coli* transkribiert wird und einen letalen Effekt erzeugt. *M. vannielii* enthält aufgrund seines niedrigen GC-Gehaltes (31 %, Balch et al., 1977) viele AT-reiche Sequenzen, die als Zufallspromotoren für die *E. coli* RNS-Polymerase dienen könnten. In einem solchen Fall würde das Genprodukt des klonierten EF-1 α Gens in den transformierten Zellen angehäuft werden und diese möglicherweise inhibieren, was zu einem Ausfall der Klone führen würde. Deshalb wurde ein weiterer Klonierungsansatz unter Verwendung des Plasmides pACYC 184 durchgeführt,

das in wesentlich geringerer Kopienzahl in der Zelle vorliegt, als pUC 19 bzw. pBR 322. Auch mit diesem Ansatz konnte das *M. vannielii* EF-1 α Gen jedoch nicht kloniert werden.

c) Anlage einer Cosmidbank

Noch weniger Kopien pro Zelle als pACYC 184, nämlich nur 2-3, liefert das Cosmid pH ϕ 79. In dieses Cosmid können bis zu 40 kb große DNS-Fragmente kloniert, die Konstrukte dann mit einem in vitro Verpackungssystem in einen λ -Phagenkopf verpackt werden. Zur Erstellung der Cosmidbank wurde chromosomale DNS aus *M. vannielii* einem Partialabbau mit Sau IIIA unterworfen. Nach Auftrennung in einem 0.35 %igen low gelling Agarose-Gel wurden DNS-Fragmente mit mehr als 20 kb Größe eluiert. Das Cosmid pH ϕ 79 wurde mit Bam HI gespalten und mit den DNS-Fragmenten von *Methanococcus* ligiert. Die ligierte DNS wurde dann mit käuflichen Verpackungsextrakten (Boehringer Mannheim) in λ -Phagenköpfe verpackt und mit diesen *E. coli* 490 A transduziert. Von den erhaltenen ca. 2000 Klonen wurden 700 (mit durchschnittlich 20 kb großen Fragmenten von *M. vannielii* DNS) in einer Koloniehybridisierung eingesetzt. Nach der Formel von Clarke und Carbon sollte bei einer angenommenen Größe von 1500 kb für das *M. vannielii* Genom, dieses in 700 Klonen zweimal vollständig repräsentiert sein (Clarke und Carbon, 1976).

Auch mit diesem Ansatz konnte jedoch das Gen für den archaeobakteriellen EF-1 α nicht kloniert werden.

Den Grund für den Mißerfolg aller aufgeführten Klonierungsansätze bildete, wie sich erst später zeigte, das *E. coli* eigene EF-Tu Gen, welches das heterologe Signal, das von der *Methanococcus*-DNS stammte, weit überstrahlte.

2. Immunologischer Ansatz zur Klonierung des Gens für EF-1 α (tuf)

Alternativ zur heterologen Hybridisierung wurden Genbanken von *M. vannielii* in λ -Phagen mit Hilfe von Antikörpern gegen den *M. vannielii* EF-1 α untersucht. Eine λ -Charon 4a-Genbank, die von

J. Auer (München) zur Verfügung gestellt wurde, sowie eine im Verlauf der vorliegenden Arbeit erstellte Genbank in λ -Charon 16 wurden getestet. Dabei wurde nach der von Young und Davis (1983) beschriebenen Prozedur vorgegangen. Die rekombinante Phagen-DNS wurde nach der Verpackung zunächst in *E. coli* Y1088 propagiert. Mit den gewonnenen Phagen wurde anschließend *E. coli* Y1090 infiziert. Dieser Stamm ist lon-Protease defizient, wodurch der Abbau exprimierter Proteine reduziert wird. Von den erhaltenen Plaques wurde ein Abklatsch auf Nitrocellulosefilter hergestellt und mit Antikörpern behandelt, wie in Material und Methoden beschrieben.

Da die Antikörper gegen *Methanococcus* EF-1 α Kreuzreaktion mit mehreren Proteinen von *E. coli* zeigten (vergleiche Abbildung 5), war es auch mit dieser Strategie nicht möglich positive Klone zu identifizieren. Eine mögliche Erklärung für die Kreuzreaktion wäre, daß die verwendeten Antikörper gegen Domänen im EF-1 α gerichtet sind, die für GDP-bindende Proteine typisch sind und damit sehr große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zeigen (Dever et al., 1987).

3. Sequenzielle Klonierung des Gens für EF-1 α

Die Mißerfolge der Klonierungsexperimente mittels heterologer Hybridisierung mit dem *E. coli* tufB Gen waren, wie schon erwähnt, auf folgendes Phänomen zurückzuführen: Das in der Koloniehybridisierung stets vorhandene Gen für den *E. coli* EF-Tu liefert ein wesentlich stärkeres Hybridisierungssignal als das Gen des *M. vannielii* EF-1 α , so daß auch bei hoher Kopienzahl der *Methanococcus*-DNS das erwartete Signal von dem des *E. coli* Gens überstrahlt wird.

Die Methode, die schließlich aufgrund dieser Erkenntnis zum Erfolg führte, war die sequenzielle Klonierung des tuf-Gens, die auf dem Prinzip der schrittweisen, selektiven Anreicherung des gewünschten DNS-Fragmentes beruht. In Abbildung 3 ist dargestellt, wie hierbei vorgegangen wurde.

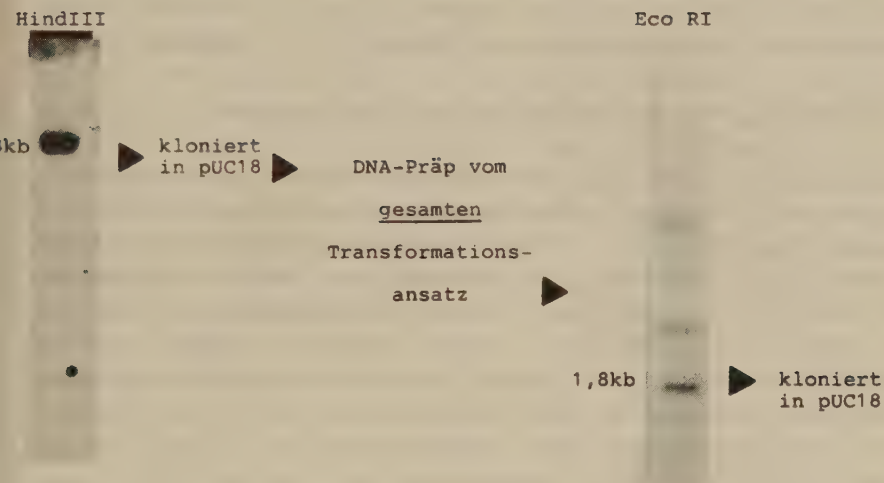


Abbildung 3:

Strategie zur Klonierung des Gens für den EF-1 α aus *M. vanielii*.

Die Hybridisierung von mit HindIII gespaltenen, chromosomalen DNS aus *M. vanielii* mit radioaktiv markiertem *E. coli* *tufB* lieferte ein Signal im Bereich von 7 kb. DNS im entsprechenden Größenbereich wurde aus einem Agarosegel eluiert, mit pUC 18 ligiert und in *E. coli* RRIAM15 transformiert. Vom gesamten Transformationsansatz wurde dann DNS präpariert und diese mit EcoRI gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung eines Aliquots der DNS und Hybridisierung mit der *tufB* Probe, wurde ein Hybridisierungssignal im Größenbereich von 1.8 kb erhalten. Der entsprechende DNS-Bereich wurde wiederum aus einem Gel eluiert, mit pUC 18 ligiert und in *E. coli* transformiert.

Von 24 Klonen des zweiten Klonierungsschrittes wurde mittels einer Plasmid-Schnellpräparation DNS isoliert, diese mit EcoRI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf Nitrocellulosefilter hybridisiert. Fünf der 24 Klone enthielten

ein EcoRI-Fragment von 1.8 kb Größe, das mit dem *E. coli* tufB Gen ein Hybridisierungssignal zeigte. Einer der fünf Klone wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt und pTU 6 benannt.

4. Rückhybridisierung des klonierten DNS-Fragmentes

Um nachzuweisen, daß der klonierte DNS-Abschnitt aus *M. vannielii* stammt, wurden Rückhybridisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-DNS aus *M. vannielii* DSM 1224 mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI bzw. NcoI gespalten. Die DNS-Fragmente wurden auf 0.8 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Das in pTU 6 enthaltene, 1.8 kb große DNS-Fragment wurde mit ^{32}P markiert und zur Hybridisierung verwendet.

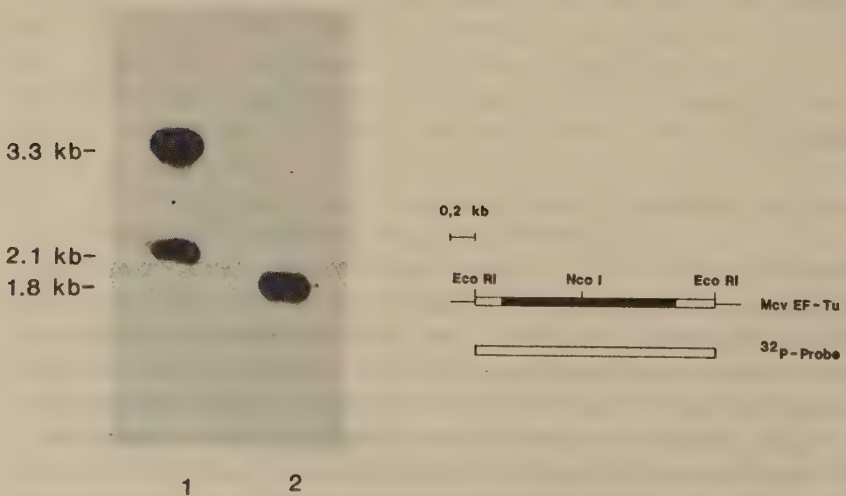


Abbildung 4:

- a) Autoradiographie einer Hybridisierung chromosomaler DNS aus *M. vannielii* mit dem klonierten Fragment aus pTU 6. 1: *Methanococcus* DNS mit NcoI gespalten, 2: *Methanococcus* DNS mit EcoRI gespalten
- b) Position der NcoI-Spaltstelle, schematisch dargestellt

Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, handelt es sich bei dem klonierten DNS-Fragment tatsächlich um einen Bestandteil des *M. vannielii*-Chromosoms. Bei Hybridisierung mit *EcoRI*-gespaltener DNS aus *M. vannielii* wird nur ein Signal im Größenbereich von 1.8 kb erhalten, mit der *NcoI* gespaltenen DNS sind es hingegen zwei Signale von 2.1 und 3.3 kb. Da das in pTU 6 klonierte DNS-Fragment eine *NcoI*-Spaltstelle enthält, kann aus diesem Befund geschlossen werden, daß die auf dem klonierten DNS-Fragment enthaltene Information nur in einer einzigen Kopie im Genom von *Methanococcus* vorliegt.

Gram-negative Eubakterien enthalten 2 Kopien des EF-Tu-Gens, für gram-positive Eubakterien ist eine Kopie beschrieben (Filer und Furano, 1981). Bei Eukaryonten wurden 2 Kopien (Nagata et al., 1984) oder 3 Kopien (Linz und Sypherd, 1987) des Gens für EF-1 α gefunden.

5. Immunologische Identifizierung des in *E. coli* klonierten Gens

Um sicherzustellen, daß das klonierte DNS-Fragment aus *Methanococcus* tatsächlich das Gen für den Elongationsfaktor 1 α trägt, wurden Immunoblot-Experimente durchgeführt. Kulturen von *E. coli* RRI Δ M15, die entweder das Plasmid pTU 6 oder das Vektorplasmid pUC 18 enthielten, wurden bis zu einer OD₄₂₀ von 0.5 angezogen, dann mit 1 mM IPTG für 1 h induziert. Anschließend wurde 1 ml der Kultur zentrifugiert, der Niederschlag in 50 μ l SDS-Auftragspuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen und das Lysat auf einem 12.5 %igen SDS- Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose wurden Proteine, die mit Antikörpern gegen EF-1 α aus *Methanococcus* reagieren, immunologisch nachgewiesen.

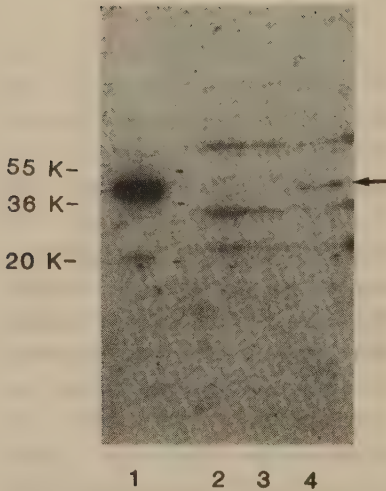


Abbildung 5:

Immunoblot von Zelllysaten aus *E. coli* RRIΔM15 mit pTU 6 (Spur 4) und pUC 18 (Spuren 2 und 3). Spur 1 enthielt gereinigtes EF-1α Protein aus *Methanococcus*.

Wie der Abbildung 5 entnommen werden kann, zeigen die Antikörper gegen *M. vannielii* EF-1α Kreuzreaktion mit mehreren Proteinen von *E. coli*. Die mögliche Ursache hierfür wurde bereits besprochen. Daneben taucht aber in demjenigen Stamm, der das Plasmid pTU 6 enthält, ein zusätzliches Signal auf. Das zugehörige Protein entspricht im Molekulargewicht genau demjenigen des EF-1α aus *Methanococcus*. Mit diesem Ergebnis konnte die Klonierung des Gens für den EF-1α aus *Methanococcus* als gegeben angesehen werden.

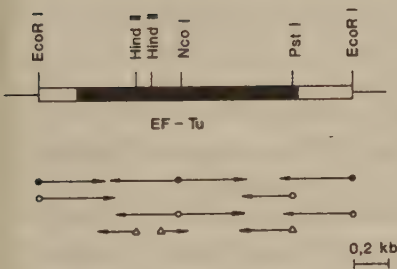
II. Sequenzierung und Analyse des Gens für EF-1α

1. Sequenzierstrategie

Das Plasmid pTU 6 wurde über einen CsCl-Gradienten gereinigt und einer Restriktionsanalyse unterworfen. Um Aufschluß über die Primärstruktur des *Methanococcus* EF-1α und damit die Möglichkeit zu Aussagen über Genstruktur, funktionelle Bereiche und Verwandtschaftsbeziehungen zu erhalten, wurde das 1.8 kb EcoRI-Fragment aus pTU 6 nach der von Maxam und Gilbert (1980) be-

schriebenen Methode sequenziert. Da auf diese Weise jedoch, wegen des Fehlens geeigneter Spaltstellen, eine vollständige Sequenzierung des inserierten DNS-Abschnittes nicht möglich war, wurden Subklone hergestellt. Dazu wurde das Plasmid pTU 6 mit EcoRI und HindII bzw. PstI gespalten. Die gewünschten Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und Elution mit entsprechend gespaltenem pUC 18 oder pUC 19 ligiert und die neu entstandenen Plasmide in JM 109 transformiert. Diese Plasmide wurden dann über die Kettenabbruchmethode (Sanger, 1977) unter Verwendung des pUC-Universalprimers (Boehringer Mannheim) sequenziert (Abbildung 6).

Abbildung 6:



Restriktionskarte der 1.8 kb- Insertion des Plasmides pTU6 und Sequenzierungsstrategie. Der offene Leserahmen des *tuf*-Gens ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. (●) bezeichnet 5'- Markierung, (○) 3'-Markierung von Fragmenten, die nach der Methode der chemischen Spaltung, (Δ) Fragmente die nach der Kettenabbruchmethode sequenziert wurden. Die für die Sequenzierung verwendeten Restriktionsspaltstellen sind eingezeichnet.

2. Nukleotidsequenz des Gens für EF-1α und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

Nach Sequenzierung beider Stränge des 1.8 kb großen EcoRI-Fragmentes aus pTU 6 wurde die DNS-Sequenz mit Hilfe eines DNS-Analyseprogrammes (Larson und Messing 1983) nach offenen Leserahmen abgesucht. Dabei wurde ein großer offener Leserahmen von 1284 Basen gefunden (Abbildung 7), der seine Entsprechung in einem Protein vom Molekulargewicht 46467 Dalton findet. In sehr guter Übereinstimmung mit dem hier ermittelten Wert wurde von Klink (1985) das Molekulargewicht des EF-1α aus *Methanococcus* zu 47000 Dalton bestimmt. Der *Methanococcus*-EF-1α ist damit kleiner als

Met Ala Lys Thr Lys Pro Ile Leu Asn Val Ala Phe Ile Gly His Val Asp Ala Gly Lys
 1 ATG GCA AAA ACA AAA CCA ATT CTT AAC GTT GCT TTT ATC GGT CAC GTA GAC GCA GGT AAA
 Ser Thr Thr Val Gly Arg Leu Leu Leu Asp Gly Gly Ala Ile Asp Pro Gln Leu Ile Val
 61 TCA ACA ACC GTA GGA AGA TTA TTA TTA GAC GGT GGA GCT ATT GAC CCA CAA TTA ATC GTT
 Arg Leu Arg Lys Glu Ala Glu Glu Lys Gly Lys Ala Gly Phe Glu Phe Ala Tyr Val Met
 121 AGA TTA AGA AAA GAA GCT GAA GAA AAA GGA AAA GCA GGA TTC GAA TTT GCT TAC GTT ATG
 Asp Gly Leu Lys Glu Glu Arg Glu Arg Gly Val Thr Ile Asp Val Ala His Lys Lys Phe
 181 GAC GGT TTA AAG GAA GAA AGA GAA AGG GGA GTT ACA ATT GAC GTA GCT CAC AAA AAA TTC
 Pro Thr Ala Lys Tyr Glu Val Thr Ile Val Asp Cys Pro Gly His Arg Asp Phe Ile Lys
 241 CCA ACC GCA AAA TAC GAA GTT ACA ATC GTA GAC TGC CCG GGC CAC AGG GAC TTC ATT AAA
 Asn Met Ile Thr Gly Ala Ser Gln Ala Asp Ala Ala Val Leu Val Val Asn Val Asp Asp
 301 AAC ATG ATT ACC GGT GCT TCA CAA GCT GAT GCA GCT GTT TTA GTT GTA AAC GTT GAC GAT
 Ala Lys Ser Gly Ile Gln Pro Gln Thr Arg Glu His Val Phe Leu Ile Arg Thr Leu Gly
 361 GCT AAA TCT GGT ATC CAA CCC CAA ACA AGA GAA CAC GTG TTC TTA ATC CGA ACT TTA GGT
 Val Arg Gln Leu Ala Val Ala Val Asn Lys Met Asp Thr Val Asn Phe Ser Glu Ala Asp
 421 GTA AGA CAG TTA GCT GTT GCA GTT AAC AAA ATG GAC ACC GTA AAC TTC TCA GAA GCT GAT
 Tyr Asn Glu Leu Lys Lys Met Ile Gly Asp Gln Leu Leu Lys Met Ile Gly Phe Asn Pro
 481 TAC AAC GAA TTA AAG AAA ATG ATT GGC GAT CAG TTA TTA AAA ATG ATT GGA TTT AAC CCT
 Glu Gln Ile Asn Phe Val Pro Val Ala Ser Leu His Gly Asp Asn Val Phe Lys Lys Ser
 541 GAA CAG ATC AAT TTT GTT CCA GTT GCT TCA CTC CAC GGT GAC AAC GTA TTC AAA AAA TCA
 Glu Arg Asn Pro Trp Tyr Lys Gly Pro Thr Ile Ala Glu Val Ile Asp Gly Phe Gln Pro
 601 GAA AGA AAC CCA TGG TAC AAG GGC CCT ACA ATT GCA GAA GTT ATT GAC GGC TTC CAA CCG
 Pro Glu Lys Pro Thr Asn Leu Pro Leu Arg Leu Pro Ile Gln Asp Val Tyr Thr Ile Thr
 661 CCT GAA AAA CCA ACT AAC TTA CCA TTA AGA TTG CCT ACT CAA GAT GTT TAC ACA ATT ACA
 Gly Val Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Ile Ile Lys Pro Gly Asp Lys
 721 GGT GTA GGT ACA GTT CCA GTA GGA AGA GTT GAA ACC GGT ATC ATT AAA CCA GGT GAC AAA
 Val Val Phe Glu Pro Ala Gly Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Val Glu Met His His Glu
 781 GTT GTC TTT GAA CCT GCT GGA GCA ATT GGA GAA ATT AAA ACT GTA GAA ATG CAC CAC GAA
 Gln Leu Pro Ser Ala Glu Pro Gly Asp Asn Ile Gly Phe Asn Val Arg Gly Val Gly Lys
 841 CAA TTA CCA AGT GCT GAA CCT GGA GAC AAC ATC GGT TTC AAC GTA AGA GGC TTT GGT AAA
 Lys Asp Ile Lys Arg Gly Asp Val Leu Gly His Thr Thr Asn Pro Pro Thr Val Ala Thr
 901 AAA GAC ATC AAG AGA GGA GAC GTT TTA GGA CAC ACT ACC AAT CCT CCA ACA GTT GCT ACT
 Asp Phe Thr Ala Gln Ile Val Val Leu Gln His Pro Ser Val Leu Thr Asp Gly Tyr Thr
 961 GAC TTT ACT GCA CAG ATT GTT GTT TTA CAA CAC CCT TCA GTA TTA ACC GAT GGA TAC ACT
 Pro Val Phe His Thr His Thr Ala Gln Ile Ala Cys Thr Phe Ala Glu Ile Gln Lys Lys
 1021 CCA GTA TTC CAC ACA CAC ACA GCA CAA ATT GCA TGT ACT TTT GCA GAA ATC CAG AAA AAA
 Leu Asn Pro Ala Thr Gly Glu Val Leu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Leu Lys Ala Gly Asp
 1081 TTA AAT CCT GCA ACT GGT GAA GTT TTA GAA GAA AAC CCA GAC TTC TTA AAA GCT GGT GAT
 Ala Ala Ile Val Lys Leu Ile Pro Thr Lys Pro Met Val Ile Glu Ser Val Lys Glu Ile
 1141 GCT GCA ATC GTT AAA TTA ATT CCT ACA AAG CCA ATG GTT ATA GAA AGC GTT AAA GAA ATT
 Pro Gln Leu Gly Arg Phe Ala Ile Arg Asp Met Gly Met Thr Val Ala Ala Gly Met Ala
 1201 CCA CAA CTT GGT AGA TTC GCA ATC AGA GAT ATG GGT ATG ACC GTT GCT GCA GGT ATG GCT
 Ile Gln Val Thr Ala Lys Asn Lys ###
 1261 ATC CAA GTT ACA GCT AAA AAC AAA TAA

Abbildung 7:

DNS- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Strukturgens für den Elongationsfaktor 1a aus *M. vanniellii* DSM 1224.

die Elongationsfaktoren einer Reihe anderer Archaeobakterien, die bei *Thermoproteus tenax*, *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanlobus tindarius* Molekulargewichte bis 53000 Dalton erreichen. Die EF-1 α Proteine aus *Desulfurococcus mobilis* und *Thermoplasma acidophilum* haben dagegen wie der Faktor aus *M. vannielii* ein Molekulargewicht von 47000 Dalton (Tiboni et al., 1987). Im Vergleich mit eubakteriellen Elongationsfaktoren nimmt *M. vannielii* eine Mittelstellung ein. Hier liegen die Werte zwischen 44000 Dalton bei *E. coli* (Arai et al., 1980) und 52000 Dalton bei Lactobacillen (Wörner et al., 1983). Eukaryotische Elongationsfaktoren (EF-1 α) haben ein Molekulargewicht um 50000 Dalton (Nagata et al., 1984; Linz et al., 1986).

3. Untersuchung der N-terminalen Aminosäuresequenz von EF-1 α

Die Aminosäuresequenz des reifen EF-1 α -Proteins kann von der in Abbildung 7 gezeigten Sequenz abweichen, wenn es bei der Proteinbiosynthese posttranslational prozessiert wird. Um die Frage zu klären, ob eine solche Prozessierung vorliegt, wurde die N-terminale Aminosäuresequenz des EF-1 α Proteins untersucht. Es konnte jedoch mit gereinigtem EF-1 α nach der von Wittmann-Liebold und Kimura (1984) beschriebenen Methode keine der Aminosäuren aus dem N-Terminus des Proteins identifiziert werden. Dagegen lieferte das stets als Kontrolle mitgeführte Peptid Bradykinin wie erwartet die Sequenz Arg-Pro-Pro-Gly-. Es muß daher angenommen werden, daß der N-Terminus des EF-1 α aus *Methanococcus* blockiert ist; blockierte N-Termini wurden auch für die EF-Tu Proteine von *E. coli* (Arai et al., 1980) und für eukaryotischen EF-1 α (Slobin et al., 1983) beschrieben.

4. Vergleich des EF-1 α aus *Methanococcus* mit anderen EF-Tu Sequenzen

Der Vergleich des EF-1 α aus *Methanococcus* mit eukaryotischen EF-1 α und eubakteriellen EF-Tu Sequenzen sollte zum einen Aufschluß geben über die phylogenetische Verwandtschaft der verglichenen

Organismen, zum anderen auch die Bestimmung funktioneller Bereiche im Methanococcus-EF-1 α ermöglichen.

Die Sequenz des EF-1 α aus Methanococcus wurde mit den Elongationsfaktoren aus anderen Organismen mit Hilfe einer Microvax A und dem Programm "Gap" nach dem Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) zunächst paarweise aligniert. Für die Berechnung wurde eine "Gap weight" von 2 gewählt. Das bedeutet, daß vom Computer nur dann eine Lücke gesetzt wird, wenn diese die Zahl der insgesamt homologen Aminosäuren um mindestens zwei erhöht. Dabei wurden nur identische Aminosäuren, nicht dagegen konservative Austausche berücksichtigt. Unter Zuhilfenahme des Alignments von Nagata et al. (1984) wurden dann von Hand alle Sequenzen gegeneinander abgeglichen.

Aus Abbildung 8 ist zu entnehmen, daß alle verglichenen Sequenzen in bestimmten Abschnitten weitgehende Identität aufweisen. Bei diesen Regionen handelt es sich zumeist um funktionelle Bereiche. So sind, wie in erster Linie durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte, die Sequenzen GlyXXXXGlyLys (E. coli: Aminosäuren 18-24) sowie AspXXGly (E. coli: Aminosäuren 80-84) verantwortlich für Phosphatbindung (La Cour et al., 1985; Journak, 1985). Die Sequenz AsnLysXAsp (E.coli: Aminosäuren 135-138) ist essentiell für die GTP-Spezifität des EF-Tu (EF-1 α) (Hwang und Miller, 1987). Die drei aufgeführten Regionen sind charakteristisch für alle GDP/GTP-bindenden Proteine (Dever et al., 1987).

Die konservierte Region zwischen Aminosäure 55 und 62 in E. coli wurde mit der tRNS abhängigen GTP-Hydrolyse in Verbindung gebracht (Van Noort et al., 1986). Von Jonak et al. (1982, 1986) wird die Region zwischen Aminosäureposition 80 und 101, die besonders gut konserviert ist (14 von 22 Aminosäuren sind in allen sechs Organismen vorhanden), sowie der Abschnitt um Lysin 237 mit tRNS-Bindung in Zusammenhang gestellt.

ARTEMIA : 1- 55: MGKE-----KIHINIVVIGHVDSGKSTITHLILYKCGGLDKRTIEKFEKAAQEMSGSEFK
 SACCH : 1- 55: MGKE-----KSHINVVVIGHVDSGKSTITHLILYKCGGLDKRTIEKFEKAAALGKGSFK
 MCV : 1- 55: MAK-----TKILNVAFIGHVDAGKSTITHLILYKCGGLDKRTIEKFEKAAALGKGSFK
 EC : 1- 44: MSKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAATITV-----IAKTYGGAAR
 SACCHMIT: 37- 81: SYAAAFDRSKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAATITK-----LAAKGGANFL
 EUGLCHL : 1- 44: MARQKFERTKEHINIGTIGHVDHGKTTLTAATITMA-----LAATGNSKAK

ARTEMIA : 56-115: YAMVLDKKAERERGITIDIALWKFPETAKYVVTIADAPGHRDFIKNMITGTSDADCAVLI
 SACCH : 56-115: YAMVLDKKAERERGITIDIALWKFPETAKYVVTIADAPGHRDFIKNMITGTSDADCAVLI
 MCV : 56-115: YAMVLDKKAERERGITIDIALWKFPETAKYVVTIADAPGHRDFIKNMITGTSDADCAVLI
 EC : 45-104: AFDQIDNAPDEKARGITINTSHVEYDTPTRHYAHVMDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILV
 SACCHMIT: 82-141: DYAAIDKAPDEKARGITITAHVEYETAKRHYSHVMDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILV
 EUGLCHL : 45-104: RYEDIDSAPDEKARGITINTAHVEYETAKRHYAHVMDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILV

ARTEMIA : 116-175: VAAGVGFEFAGTSKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVGVNKMSTEPFSEARFEEIKKEVS
 SACCH : 116-173: IAGVGFEFAGTSKNGQTRHALLAYTLGVRLIVAVNKMDSVKWDES--RFQEIYKETS
 MCV : 116-170: VNVDAKS--GT--QPTREHVFLIRTLGVRLIAVAVNKMOTVNFSEAD--YNEIKKMIGD
 EC : 105-154: VAATDGM-----POTREHLLGRQGVGPYIIVFLNKMDVDDDEE---LLELVEMEV
 SACCHMIT: 142-191: VAATDGM-----POTREHLLARQGVQVHIVFVFNKVDITDDPE---MLELVEMEMR
 EUGLCHL : 105-154: VSAADGM-----POTKEHILLAKQGVCPNIVFLNKEDQVDDSE---LLELVLEIR

ARTEMIA : 176-235: AYIKKIGYNRAAVAFVPISGWHDNDMLEASDRLPVYKGNWIERKEGKADGKTLLDALDAI
 SACCH : 174-233: NFILKVGYNKTVFVPISGWHDNDMIEATTNAPVYKGEKETKAGVVGKTLLEAHDAI
 MCV : 171-220: QLKIMGFNBEQINIEVVPVASTHGDNVYFKKSERNEVYK-----PDAEVIDG
 EC : 155-199: ELLSQYDFPGDDTPIVRGSALKALEGD-----AE-WEAKILELAGFLDSYI
 SACCHMIT: 192-212: ELLNEYGDFGDNDAPIMGSALKALEGR-----QBEIGQAMKLLDAVDEYI
 EUGLCHL : 155-209: ETUSNYDFPGDDIPVIPSAL--LSVEALTKNPKITKGEN---KWVDKILNLMDOVDSYI

ARTEMIA : 236-292: LPPSRPTEKFLRLPLDVMYKIGGIGTVVGRVETGLIKPDM---IVTFAPANITTEVMSV
 SACCH : 234-290: EOPSRTDDEKFLRLPLDVMYKIGGIGTVVGRVETGLIKPDM---VVTFAPAGVTTTEVMSV
 MCV : 221-275: QPPEKFTNLFLRLPLDVMITGVGTVGRVETGLIKPDM---KVVEFPAAGIAGIKTV
 EC : 200-258: PEPERADIKPFLLPIDEDVFSISGRGTVTVGRVERGIKVGEEVEIVGIKETQ--KSTCTGV
 SACCHMIT: 239-298: PTPERDLNKPFLMPVEDIFSISGRGTVTVGRVERGNLKGEELEIVGHNSTPLKTVTGI
 EUGLCHL : 210-268: PTPTRDTEKDFLMAIEDVLSITGRGTVTATGRVERGTIKVGETVELVGLKDTR--STTITGL

ARTEMIA : 293-352: EMHHELEQASFGDNVGFNVKNMVSVKELRRRGVVASDSKNNPARGSQDFFAQVIVLNLHFGQ
 SACCH : 291-350: EMHHELEQGVFGDNVGFNVKNMVSVKELRRRGVNCGDAKNDPEPKGCASFNATVIVLNLHFGQ
 MCV : 276-334: EMHHEQLPSAEFGDNIGFNVGRGVGMKIDKRGDVLGHTINPHTVA--DFTAQIVVLQHSFV
 EC : 259-316: EMFRKLDEGPAENGVLLRGIRKREIEERGQVLAKPGTIKPH--TKFSEVYILSKDEG
 SACCHMIT: 299-356: EMFRKELDSAMAGDNAGVLLRGIRRDQLKRGVMTAKPGTVKAH--TKILASLYILSKEEG
 EUGLCHL : 269-326: EMFQKSLDEALAGDNVGVLLRGIQKNDVERGMVLAKPRTINPH--TKFDSQVYILKEEG

ARTEMIA : 353-407: ISN-----GYTFMLDCHTAHTACKFAEIKERCDRRTGKTTEAEKPKIRSGDAAMITLVPS
 SACCH : 351-405: ISA-----GYSPVLGCHTAHTACREDELLENDRRSCKKLEDHPKELKSGDAALVKFVPS
 MCV : 335-390: LTD-----GYTFMFHTTAQTAHTFAEIQKLNPAITGEVLEENDELKAGDAIVKLIT
 EC : 317-363: GRHTPFPGKYRPOQYFRTTDTVTGTI--ELPEGVEM-----VMPGDNKMVMVTLI
 SACCHMIT: 357-407: GRHSFGGKNYRPMQFIRTTADTVVM-----RFPKEVEDHSMQVMPGDNKMVMECDLI
 EUGLCHL : 327-378: GRHTPFPEGYRPOFYVRTTDTVTGKIESF-----RSDN--DNPAQVMPGDNKMVLELI

ARTEMIA : 408-460: KPLCVEAFSDPEPLGRFAVRDMQTVAVGVKISVNFK--QTAGKVTKAAEKAGKKKJ
 SACCH : 406-458: KPMCVEAFSEFPLGRFAVRDMQTVAVGVKISVD--KTEKAAKVTKAAQKAAKK
 MCV : 391-428: KPMVIESVKEIPLGRFAVRDMQTVAVAGMAIQVTAKNK
 EC : 364-437: HPIAMDD-----GLRFAITREGRTVAGVAVKVLG
 SACCHMIT: 408-493: HPTPLEV-----GQRFNITREGRTVGTGLITRIIE
 EUGLCHL : 379-408: OPTAIEK-----GMRFAITREGRTVAGVAVLSIIQ

Abbildung 8:

Vergleich der Aminosäuresequenz des EF-1 α aus *Methanococcus* (MCV) mit den Sequenzen von EF-1 α aus *Artemia salina* (ARTEMIA) (Lenstra et al., 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (SACCH) (Nagata et al., 1984; Cotrelle et al., 1985) und mit den Sequenzen des E. coli tufB Genproduktes (EC) (An und Friesen 1980), des EF-Tu aus Mitochondrien von *S. cerevisiae* (SACCHMIT) (Nagata et al., 1983) sowie des EF-Tu aus Chloroplasten von *Euglena gracilis* (EUGLCHL) (Montandon und Stutz 1983). Aminosäuren, die in allen sechs verglichenen Sequenzen an der gleichen Position stehen, wurden durch Balken über und unter dem entsprechenden Sequenzabschnitt gekennzeichnet. Positionen, in denen Identität ausschließlich zwischen Eukaryonten und *Methanococcus*, oder aber zwischen Eubakterien oder Organellen und *Methanococcus* besteht, sind umrahmt. Der Pfeil bezeichnet die Position desjenigen Alaninrestes, der von Swart et al., (1982) mit der Kirromycinbindung in Bezug gesetzt wurde.

Weiterhin fällt in Abbildung 8 folgendes auf: Die Sequenz des EF-1 α aus *Methanococcus* zeigt wesentlich höhere Ähnlichkeit mit den eukaryotischen EF-1 α Sequenzen als den mit eubakteriellen EF-Tu Sequenzen. Die meisten "Insertionen" oder "Deletionen" in *Methanococcus* stimmen mit dem eukaryotischen Sequenzmuster überein. Insbesondere existiert gute Übereinstimmung mit den Eukaryonten in solchen Abschnitten des Moleküls, die in den eubakteriellen Sequenzen deletiert sind. Besonders deutlich wird dies beispielsweise in den Abschnitten zwischen Aminosäure 30 und 45 und zwischen Position 123 und 126 (*Methanococcus* Nomenklatur), aber auch zwischen Position 398 und 403. Außerdem sind die Positionen 4-7, 241-243 und 320-324 (E. coli Nomenklatur) in den Sequenzen aus Eukaryonten und *Methanococcus* deletiert, nicht dagegen in den eubakteriellen Sequenzen. Auf der anderen Seite findet man keine Deletionen, die Eubakterien und *Methanococcus* gemeinsam sind.

5. Ähnlichkeit und phylogenetische Distanz

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen bildet die Grundlage zur Berechnung von Ähnlichkeit und phylogenetischer Distanz der

untersuchten Proteine und damit für die Erstellung von Stammbäumen. In diesen Vergleich wurde, zusätzlich zu den in Abbildung 8 gezeigten Proteinen, auch die Aminosäuresequenz eines der drei EF-1 α Proteine aus *Mucor (Mu) racemosus* (Linz et al., 1986) einbezogen. Zwei weitere mittlerweile publizierte EF-Tu bzw. EF-1 α Sequenzen, Human EF-1 α (Brands et al., 1986) und *Thermus thermophilus* EF-Tu (Seidler et al., 1987; Kushiro et al., 1987) wurden wegen des dadurch erheblich anwachsenden Rechenaufwandes noch nicht berücksichtigt.

a) Berechnung der Ähnlichkeit

Die Ähnlichkeit zwischen zwei alignierten Sequenzen wurde wie folgt ermittelt:

Ausgegangen wurde von der Zahl der Aminosäuren in der kürzeren von zwei verglichenen Sequenzen. Davon wurde die Zahl an Aminosäuren abgezogen, die einer Lücke in der angepaßten Sequenz gegenüberstanden.

Aus den verbleibenden Aminosäuren wurde mit dem Quotienten

$$\frac{\text{Zahl der identischen Aminosäuren}}{\text{Gesamtzahl der Aminosäuren}}$$

die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen in % erhalten.

b) Ermittlung der Mutationsdistanzen

Ein noch genaueres Bild des phylogenetischen Abstandes der verglichenen Moleküle kann die Bestimmung der "Mutationsdistanz" nach Fitch und Margoliash (1967) liefern. Dabei wird für jeden Aminosäureaustausch die Zahl an Nukleotiden ermittelt, die auf der Ebene der DNS mindestens nötig sind, um von Aminosäure A zu Aminosäure B zu gelangen. Dies sei an einem Beispiel erläutert: Um von der Aminosäure Leucin zu Isoleucin zu gelangen, muß auf DNS-Niveau mindestens 1 Nukleotid ausgetauscht werden, z.B. von CUU nach AUU. Um von der Aminosäure Methionin (AUG) zu Cystein (UGU, UGC) zu kommen, sind dagegen

drei Austausche vonnöten. Die "Mutationsdistanz" gibt nun die Zahl von Nukleotidaustauschen an, die mindestens benötigt werden, um von einem Protein 1 zu Protein 2 zu gelangen.

Ähnlichkeit und Mutationsdistanz der Elongationsfaktoren geht aus Tabelle 4 hervor. Die erhaltenen Werte lassen sich in mehrere Blöcke gliedern. Eukaryotische wie eubakterielle Elongationsfaktoren weisen untereinander große Ähnlichkeit auf.

Der M. vanniellii EF-1 α steht den eukaryotischen Sequenzen nahe; sein Abstand zu den eubakteriellen Sequenzen ist dagegen etwa so groß wie derjenige zwischen eukaryotischen und eubakteriellen.

Tabelle 4:

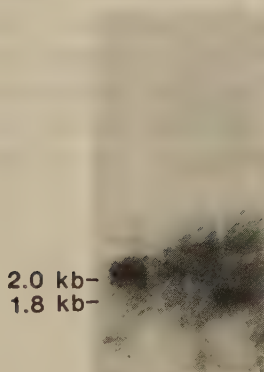
In der linken unteren Hälfte der Tabelle ist die Ähnlichkeit der Elongationsfaktoren aufgeführt (in %), in der rechten oberen Hälfte die "Mutationsdistanz".

	1	2	3	4	5	6	7
1 A. salina	-	129	129	275	383	389	389
2 S. cerevisiae	81.3	-	95	274	378	393	378
3 Mu. racemosus	77.3	84.5	-	278	375	378	389
4 M. vanniellii	53.8	52.6	51.0	-	359	354	378
5 E. coli	31.8	32.5	33.5	34.7	-	142	178
6 Eu. gracilis (Ch1)	30.9	31.2	32.5	34.5	71.7	-	198
7 S. cerevisiae (Mito)	32.6	31.3	28.6	35.1	64.9	62.2	-

6. Hybridisierungen mit T. tenax und H. halobium

Da die Ermittlung der Aminosäuresequenz eines EF-1 α aus einem weiteren Archaeobakterium aus phylogenetischer Sicht wünschenswert erschien, wurden Hybridisierungsexperimente mit chromosomaler DNS aus T. tenax DSM 2078 und H. halobium DSM 670 durchgeführt. Als Hybridisierungssonde diente das 1.8 kb EcoRI-Fragment aus pTU 6. Hybridisiert wurde unter "heterologen" Bedingungen.

Sowohl mit DNS aus T. tenax als auch aus H. halobium konnten Hybridisierungssignale erhalten werden. Diese waren allerdings bei beiden Organismen stets so schwach, daß eine Klonierung der entsprechenden Gene nicht möglich war. Die geringe Intensität der Hybridisierungssignale kann auf dem von M. vanniellii sehr verschiedenen GC-Gehalt der DNS der beiden Organismen beruhen. Dies führt zu einer veränderten Kodonauswahl, was bedingt, daß trotz großer Ähnlichkeit der Proteine nur relativ geringe Ähnlichkeit auf DNS-Niveau existiert.



1

2

Abbildung 9:

Die Abbildung zeigt eine Hybridisierung des EF-1 α -Gens aus Methanococcus mit EcoRI-gespaltener DNS aus H. halobium (Spur 1) und T. tenax (Spur 2).

III. Klonierung und Sequenzierung von das EF-1 α Gen flankierenden DNS-Bereichen aus Methanococcus

1. Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie

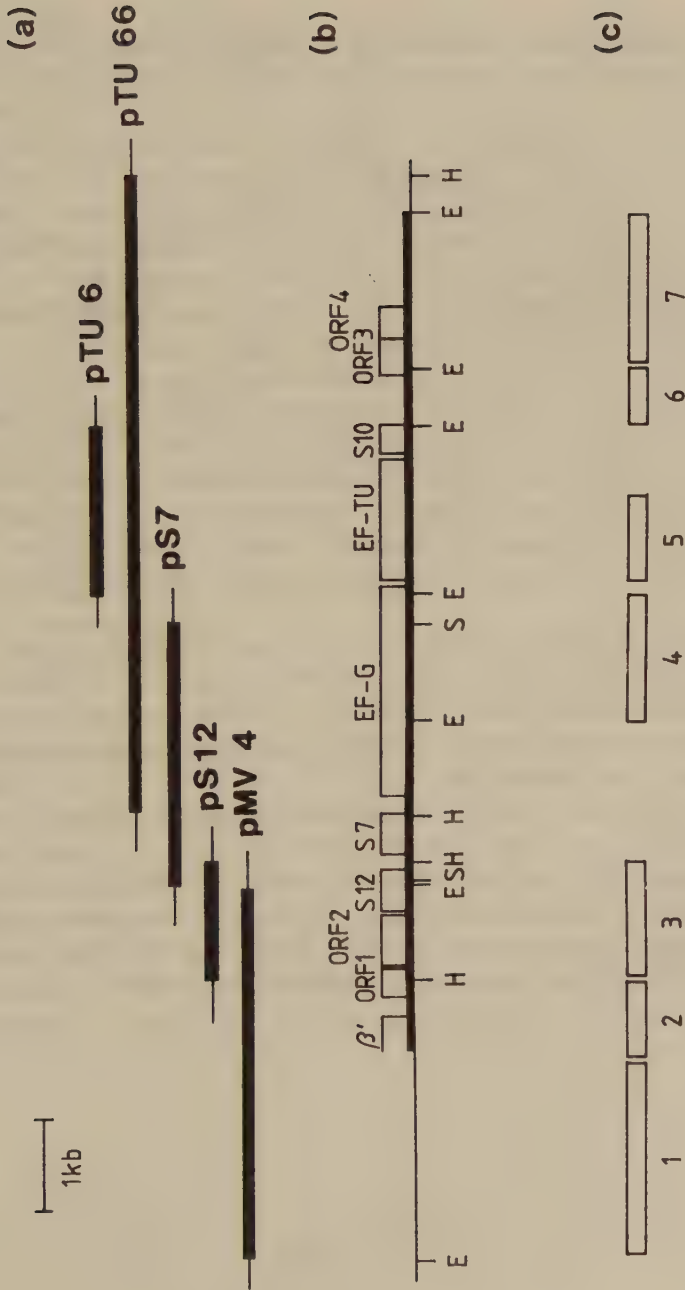
Die vorläufige Analyse der an das *tuf* Gen in 5'- und 3'- Richtung angrenzenden DNS-Abschnitte legte die Vermutung nahe, daß weitere Strukturgene unmittelbar benachbart sind. Auf den stromauf und stromab des *tuf* Gens gelegenen Abschnitten der Methanococcus-DNS wurden dann tatsächlich offene Leserahmen gefunden, die im folgenden beschrieben werden.

Aus den Hybridisierungsexperimenten war bekannt, daß das EF-1 α -Gen in Methanococcus auf einem 6.6 kb HindIII-Fragment liegen muß. So konnte aus den Klonen, die im ersten Schritt der in Abschnitt I.3. beschriebenen Klonierung erhalten worden waren, durch Koloniehybridisierung unter "homologen" Bedingungen ein Klon gefunden werden, der das *tuf* Gen aus *M. vannielii* auf einem 6.6 kb HindIII-Fragment trägt. Ausgehend von dem aus diesem Klon erhaltenen Plasmid, das pTU 66 genannt wurde, konnten ebenfalls über "homologe" Hybridisierung die Plasmide pS 7, pS 12 und pMV 4 erhalten werden. Diese enthalten weiter stromaufwärts gelegene Teile des Methanococcus-Chromosoms. Als Vektorplasmid wurde hierbei stets pUC 18 eingesetzt. Die Lage dieser Fragmente im *M. vannielii* Genom und deren Umfang kann der Abbildung 10 entnommen werden.

Abbildung 10 (folgende Seite):

Physikalische Karte des untersuchten DNS-Bereiches aus *M. vannielii*.

- a) Lage der verwendeten Klone
- b) Restriktionskarte mit Spaltstellen, die für die Klonierung von Bedeutung waren
- c) DNS-Abschnitte, die in Northernblot-Experimenten als Hybridisierungsprobe eingesetzt wurden



Die Sequenzierung erfolgte im wesentlichen nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung von Exonuklease III-Deletionsklonen.

Dazu wurden zunächst 1.6, 0.65 und 1.3 kb große EcoRI-Fragmente aus pTU 66, ein 1.9 kb EcoRI/SacI-Fragment aus pS 7 und ein 1.8 kb EcoRI/HpaI-Fragment aus pMV 4 in M13mp 18 einligiert und damit JM 109 transfiziert. Klone, welche die inserierten Fragmente in jeweils entgegengesetzter Orientierung, bezogen auf die Ansatzstelle des universellen Primers, enthielten, wurden ausgewählt. Das 1.2 kb HindIII-Fragment aus pS 12 konnte nur in einer Orientierung in M13mp 18 stabil gehalten werden. Um die DNS-Insertion auch in der bezüglich des Primers entgegengesetzten Orientierung zu erhalten, wurde es mit pUC 19 ligiert und in JM 109 transformiert. Für die Sequenzierung wurden von den in M 13 bzw. pUC 19 erhaltenen DNS-Fragmenten mittels Exonuklease III nach dem Verfahren von Henikoff (1984) Deletionsklone hergestellt. Die Arbeitsweise ist in Abbildung 11 kurz erläutert.

Exonuklease III hat die Eigenschaft, an Spaltstellen in doppelsträngiger DNS mit 5'- überhängenden Enden den 3'-rückstehenden Strang abzubauen. Spaltstellen mit 3'- überhängenden Enden werden dagegen nicht angegriffen. Wird ein zu verkürzendes Fragment mit zwei Restriktionsenzymen gespalten, von denen eines 3'- überhängende Enden, das andere 5'- überhängende Enden erzeugt, z.B. PstI und BamHI, so kann der Abbau der DNS nur in einer Richtung erfolgen. Die verbleibenden 5'- überhängenden Enden werden mit Nuklease S1 abgespalten. Über die damit entstandenen stumpfen Enden wird das Molekül rezirkularisiert, in JM 109 transformiert bzw. transfiziert und steht dann zur Sequenzanalyse zur Verfügung.

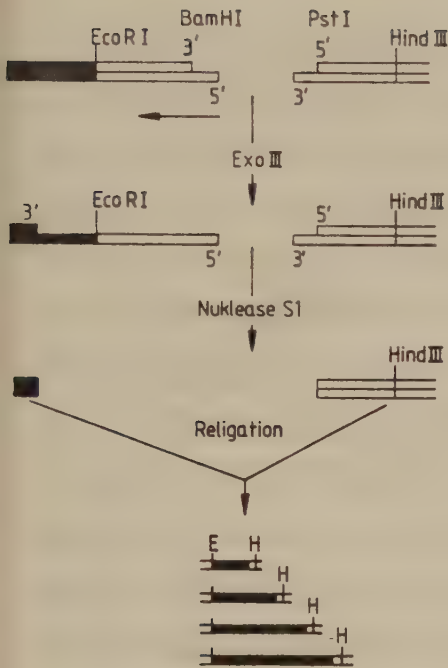


Abbildung 11:

Vorgehen bei der Erzeugung von Exonuklease III-Deletionsklonen. Offene Balken entsprechen dem Polylinker von pUC bzw. M13, schwarze Balken der inserierten DNS.

2. Gen für den Elongationsfaktor 2 (fus)

a) DNS- und daraus abgeleitete Proteinsequenz

In einem Abstand von 132 Nukleotiden folgt stromaufwärts relativ zum Gen für EF-1 α ein offener Leserahmen, der einem Protein vom Molekulargewicht 80161 Dalton entspricht (Abbildung 12). Das entsprechende Genprodukt wurde als Elongationsfaktor 2 identifiziert und zwar mit Hilfe von Daten aus einer Publikation von Gehrman und Mitarbeitern (1985).

1 Met Gly Arg Arg Ala Lys Met Val Glu Lys Val Lys Ser Leu Met Glu Thr His Asp Gln
 ATG GGA AGA CGA GCA AAA ATG GTT GAA AAG GTT AAA TCC TTA ATG GAA ACC CAC GAC CAA
 61 Ile Arg Asn Met Gly Ile Cys Ala His Ile Ala His Gly Lys Thr Thr Leu Ser Asp Asn
 ATT AGG AAC ATG GGT ATT TGT GCC CAC ATT GCA CAC GGT AAG ACT ACA TTA TCT TGT AAC
 121 Leu Leu Ala Gly Ala Gln Gly Met Ile Ser Lys Asp Leu Ala Gly Asp Gln Leu Ala Leu Asp
 TTA CTT GCA GGA GCA GGT ATG ATT TCA AAA GAT TTA GCA GGA GAC CAA CTT GCA CTT GAC
 181 Phe Asp Glu Glu Glu Ala Ala Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Ala Asn Val Ser Met Val
 TTC GAT GAA GAA GAA GCT GCA AGA GGT ATT ACA ATC TAT GCT GCA AAC GTT TCA ATG GTA
 241 His Glu Tyr Asn Gly Lys Glu Tyr Leu Ile Asn Leu Ile Asp Thr Pro Gly His Val Asp
 CAC GAA TAT AAT GGA AAA GAG TAT TTA ATT AAC TTA ATT GAT ACA CCA GGT CAC GTT GAC
 301 Phe Gly Gly Asp Val Thr Arg Ala Met Arg Ala Ile Asp Gly Ala Val Val Val Cys Cys
 TTT GGT GGT GAC GTA ACA AGG GCA ATG GAG GCA ATC GAC GGT GCA GTA GTT GTT TGT TGT
 361 Ala Val Glu Gly Val Met Pro Gln Thr Glu Thr Val Leu Arg Gln Ala Leu Lys Glu Lys
 GCA GTA GAA GGC GTT ATG CCT CAG ACT GAA ACT GTT TTA AGA CAG GCG TTA AAA GAA AAA
 421 Val Lys Pro Val Leu Phe Ile Asn Lys Val Asp Arg Leu Ile Asn Glu Leu Lys Leu Thr
 GTT AAA CCT GTT TTG TTT ATT AAC AAA GTT GAC AGG TTA ATT AAC GAA TTA AAG TTA ACT
 481 Pro Glu Glu Leu Gln Gly Arg Phe Met Lys Ile Ile Ala Glu Val Asn Lys Leu Ile Glu
 CCT GAA GAA TTA CAA GGA CGA TTC ATG AAA ATT ATC GCT GAA GTC AAT AAA TTA ATC GAA
 541 Lys Met Ala Pro Glu Glu Phe Lys Lys Glu Trp Leu Cys Asp Val Val Thr Gly Lys Val
 AAA ATG GCT CCA GAA GAA TTT AAG AAA GAA TGG CTC TGT GAT TTA GTC ACT GGA AAA GTT
 601 Ala Phe Gly Ser Ala Tyr Asn Asn Trp Ala Ile Ser Val Pro Tyr Met Gln Lys Ser Gly
 GCT TTT GGT TCA GCA TAC AAT AAC TGG GCA ATT TCA GTT CCA TAC ATG CAG AAA TCA GGA
 661 Ile Ser Phe Lys Asp Ile Ile Asp Tyr Cys Glu Gln Glu Lys Gln Ser Glu Leu Ala Asp
 ATT TCA TTT AAA GAC ATT ATT GAC TAC TGT GAA CAG GAA AAA CAG TCA GAA TTA GCT GAT
 721 Lys Ala Pro Leu His Glu Val Ile Leu Asp Met Ala Ile Lys His Leu Pro Asn Pro Leu
 AAA GCT CCA CTT CAC GAA GTT ATT CTT GAC ATG GCA ATC AAA CAC TTG CCA AAC CCA CTC
 781 Gln Ala Gln Lys Tyr Arg Ile Pro Asn Ile Trp Lys Gly Asp Ala Glu Ser Glu Val Gly
 CAA GCT CAA AAA TAC AGA ATT CCA AAC ATT TGG AAG GGA GAT GCA GAA TCT GAA GTT GGT
 841 Lys Ser Met Ala Met Cys Asp Pro Asn Gly Pro Leu Ala Gly Val Val Thr Lys Ile Ile
 AAA TCC ATG GCA ATG TGT GAC CCT AAT GGA CCA CTT GCA GGT GTT GTT ACA AAA ATT ATT
 901 Val Asp Lys His Ala Gly Ser Ile Ser Ala Cys Arg Leu Phe Ser Gly Arg Ile Lys Gln
 GTT GAC AAA CAC GCA GGT TCA ATT TCA GCA TGC AGA TTG TTT TCT TCT GGA AGA ATC AAA CAA
 961 Gly Asp Glu Leu Tyr Leu Val Gly Ser Lys Gln Lys Ala Arg Ala Gln Gln Val Ala Ile
 GGT GAC GAA TTA TAC CTT GTA GGC TCT AAA CAA AAG GCA AGA GCA CAA CAA GTT GCT ATC
 1021 Phe Met Gly Ala Glu Arg Val Gln Val Pro Ser Ile Ser Ala Gly Asn Ile Cys Ala Leu
 TTC ATG GGT GCT GAA AGA GTT CAA GTG CCA AGC ATT TCC GCA GGA AAC ATT TGT GCA TTA
 1081 Thr Gly Leu Arg Glu Ala Thr Ala Gly Glu Thr Val Cys Ser Pro Ser Lys Ile Leu Glu
 ACG GGT TTA AGA GAA GCT ACT GCT GGA GAA ACC GTA TGT AGC CCA TCA AAA ATT TTA GAA
 1141 Pro Gly Phe Glu Ser Leu Thr His Thr Ser Glu Pro Val Ile Thr Val Ala Ile Glu Ala
 CCC GGA TTT GAA TCT TTG ACC CAC ACA TCT GAA CCA GTA ATT ACT GTT GCA ATC GAA GCT
 1201 Lys Asn Thr Lys Asp Leu Pro Lys Leu Ile Glu Ile Leu Arg Gln Ile Gly Arg Glu Asp
 AAA AAC ACG AAA GAT TTA CCG AAA TTA ATC GAG ATT TTA AGG CAG ATT GGA AGA GAA GAT
 1261 Asn Thr Val Arg Ile Glu Ile Asn Glu Glu Thr Gly Glu His Leu Ile Ser Gly Met Gly
 AAC ACT GTA AGA ATC GAA ATC AAT GAA GAA ACC GGT GAA CAC TTA ATC AGC GGT ATG GGT
 1321 Glu Leu His Ile Glu Val Ile Thr Asp Thr Lys Ile Gly Arg Asp Gly Gly Ile Glu Val
 GAA CTC CAC ATT GAA GTT ATT ACA GAT ACC AAG ATT GGA AGG GAC GGT GGA ATT GAA GTA
 1381 Asp Val Gly Glu Pro Ile Ile Val Tyr Arg Glu Thr Ile Thr Gly Thr Ser Pro Glu Ile
 GAT GTT GGT GAA CCA ATT ATC GTT TAT AGG GAA ACC ATT ACA GGA ACT TCC CCT GAA ATT

1441	Glu	Gly	Lys	Ser	Pro	Asn	Lys	His	Asn	Lys	Leu	Tyr	Met	Ile	Ala	Glu	Pro	Met	Glu	Glu
	GAA	GGA	AAA	TCA	CCA	AAC	AAG	CAC	AAC	AAG	CTC	TAC	ATG	ATT	GCA	GAA	CCA	ATG	GAA	GAG
1501	Ser	Val	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Ile	His	Asp	Glu	Asp	Phe	Lys	Lys	Lys	Thr
	TCA	GTT	TAT	GCA	GCA	TAC	GTT	GAA	GGT	AAA	ATC	CAC	GAT	GAA	CAC	TTC	AAA	AAG	AAG	ACT
1561	Asn	Val	Asp	Ala	Glu	Thr	Arg	Leu	Ile	Glu	Ala	Gly	Leu	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Lys
	AAC	GTA	GAT	GCA	GAG	ACT	AGG	TTA	ATC	GAA	GCT	GGA	CTT	GAA	AGA	GAA	CAG	GCT	AAA	AAA
1621	Val	Met	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asn	Met	Ile	Val	Asn	Met	Thr	Lys	Gly	Ile	Val	Gln	Leu
	GTT	ATG	TCA	ATT	TAC	AAT	GGA	AAC	ATG	ATT	GTA	AAC	ATG	ACA	AAA	GGT	ATT	GTT	CAA	CTC
1681	Asp	Glu	Ala	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Gly	Phe	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu
	GAT	GAA	GCA	AGA	GAA	TTA	ATC	ATT	GAG	GGT	TTC	AAA	GAA	GGT	GTA	AAA	GGA	GGG	CCA	CTT
1741	Ala	Ser	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Val	Lys	Ile	Lys	Leu	Ile	Asp	Ala	Thr	Phe	His	Glu	Asp
	GCA	TCT	GAA	AGA	GCT	CAA	GGA	GTA	AAA	ATC	AAA	CTA	ATT	GAT	GCA	ACT	TTC	CAC	GAA	GAT
1801	Ala	Ile	His	Arg	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Ile	Pro	Ala	Ile	Arg	Phe	Gly	Val	Arg	Asp	Ala
	GCA	ATC	CAC	AGA	GGG	CCT	TCA	CAA	ATC	ATC	CCT	GCA	ATT	AGA	TTT	GGA	GTA	AGA	GAT	GCA
1861	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Ile	Leu	Leu	Glu	Pro	Met	Gln	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Thr	Pro
	GTT	TCA	AGT	GCA	AAA	CCA	ATT	CTC	TTG	GAA	CCT	ATG	CAA	AAA	ATT	TAC	ATT	AAC	ACG	CCA
1921	Gln	Asp	Tyr	Met	Gly	Asp	Ala	Ile	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Arg	Arg	Gly	Gln	Ile	Val	Asp
	CAG	GAT	TAC	ATG	GGT	GAT	GCG	ATC	AGA	GAA	ATC	AAC	AAC	AGG	AGA	GGG	CAG	ATT	GTT	GAC
1981	Met	Glu	Gln	Glu	Gly	Asp	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Gly	Ser	Val	Pro	Val	Ala	Glu	Met	Phe
	ATG	GAA	CAG	GAA	GGT	GAC	ATG	GCA	ATT	ATC	AAA	GGA	AGT	GTT	CCT	GTT	GCT	GAA	ATG	TTT
2041	Gly	Phe	Ala	Gly	Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Arg	Cys	Leu	Trp	Ser	Val	Glu	Phe
	GGA	TTC	GCT	GGT	GCA	ATT	CGT	GGT	GCA	ACC	CAA	GGT	AGA	TGT	TTA	TGG	AGT	GTT	GAA	TTC
2101	Ser	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Pro	Asn	Glu	Ile	Gln	Thr	Lys	Val	Val	Ala	Gln	Ile	Arg	Asp
	TCA	GGA	TTC	GAA	AGA	GTA	CCA	AAT	GAA	ATT	CAA	ACT	AAG	GTT	GTT	GCT	CAA	ATT	AGA	GAC
2161	Arg	Lys	Gly	Leu	Lys	Ser	Glu	###												
	AGA	AAA	GGT	TTA	AAA	TCA	GAA	TAA												

Abbildung 12:

DNS- und abgeleitete Proteinsequenz des Gens für den Elongationsfaktor 2 (EF-G) aus *M. vanniellii*. Das von Gehrman et al. (1985) sequenzierte Peptid ist umrandet. Durch einen Kreis wurde dasjenige Histidin gekennzeichnet, das im Protein zu Diphthamid modifiziert ist. Von drei möglichen Startstellen des Proteins wurde in der Abbildung die am weitesten stromaufwärts liegende Position berücksichtigt.

Diese Autoren hatten nämlich ein Peptid aus dem EF-2 von *M. vanniellii* sequenziert, welches den Bereich umfasst, in dem die ADP-Ribosylierung durch Diphtherietoxin erfolgt. Es besitzt die Sequenz Leu-Ile-Asp-Ala-Thr-Phe-His-Glu-Asp-Ala-

Ile-Dip-Arg und findet sich in der Sequenz des 80 kD-Protein wieder (Abbildung 12). Nur in einem Punkt unterscheidet sich das sequenzierte von dem aus der DNS-Sequenz abgeleiteten Peptid: Während in der DNS an der vorletzten Aminosäureposition das Kodon für Histidin steht, wurde in der zugehörigen Peptidsequenz Diphthamid, ein modifiziertes Histidin, gefunden. Dieses Diphthamid, das auch in eukaryotischen EF-2 Sequenzen an entsprechender Position gefunden wird (Khono et al., 1986), ist der Ansatzpunkt der ADP-Ribosylierung und wird offenbar in einer posttranslationalen Modifikationsreaktion aus Histidin gebildet. Damit konnte das Protein eindeutig als der Elongationsfaktor 2 (oder EF-G) aus *M. vannielii* identifiziert werden.

b) Vergleich von EF-2 (EF-G)-Sequenzen

Die in Abbildung 12 gezeigte Aminosäuresequenz wurde mit den Sequenzen des EF-G aus *E. coli* (Zengel et al., 1984) und des EF 2 aus Hamster (Khono et al., 1986) aligniert (Abbildung 13). Die dabei gefundene Ähnlichkeit der Sequenzen bestätigt, daß es sich bei dem Protein um den Elongationsfaktor 2 handelt. Besondere Beachtung verdienen neben der Position, die in Archaeobakterien wie in Eukaryonten Ziel der ADP-Ribosylierung ist, diejenigen Sequenzabschnitte, die charakteristisch für GTP-bindende Proteine sind (Dever et al., 1987) und sowohl in EF-2 wie in EF-G hoch konserviert sind. Es sind dies die Positionen 16-22; 87-91 und 141-144 (*E. coli* Nomenklatur). Abgesehen vom N-terminalen Abschnitt mit den GTP-Binderegionen weisen eukaryotisches und archaeobakterielles EF-2-Molekül deutlich geringere Ähnlichkeit auf, als im Falle von EF-1 α . Auch hier ist aber die Ähnlichkeit zur eukaryotischen Sequenz größer als zur eubakteriellen (Tabelle 5).

Die Analyse mit dem Programm "Bestfit" (Tabelle 6), welches auch die konservativen Aminosäureaustausche berücksichtigt, bestätigt dieses Ergebnis.

HAMSTER 1 --MVNFTMDQIRAIMDKKANIRMSVIAHVHDKSTLIDSLVCKAG--ITASARAGETRF
 MCV 1 MGRRAKMYEKVKSLIMETHDQIRMGITCAHTIDHGKITLSDNLIAGAG--MISKDLAQDQLA
 EC 1 -----ARTTPIARYRNIIGISAHLDAGKITTTTERILFYTGTVNHKIGEVHDGAAT

HAMSTER 57 TDTRKDEQERCITIKSTAIISLFYELSENDLNFIKQSKDGSGFLINLIDSPGHVDFSSEVT
 MCV 59 LDPDDEEAARGITIYANVMVME-----YNGKEYLILINLIDTPGHVDFGGDVT
 EC 49 LDWMDEQERGITITISATTAFF-----WSGMAKQYEPHRINIIDTPGHVDFTIEVE

HAMSTER 117 AALRVTDGALVVDCVSGVCVQIETVLRQAIARIKPVLMMNKMDRALLETQDEPEELYQ
 MCV 107 RAMRAIDGAMVVCACVEGVMPQIETVLRQALKEKVPVLFINKVDRLINELKLITPEELQ
 EC 100 RSMRVLDGAMVVCAGGVQIETVWRQANKYKVPRIAEVFNKMDR-----

HAMSTER 177 TFORIVENVNVIISTYGEESGPMGNIMILFVLGTVGFGSLGHGWAFTLKQFAEMYVAKF
 MCV 167 RFMKIIAEVNKILIEKMAPEE--FKKEWLDVWIGKVAEGSAYNNWA-----
 EC 146 -----MGANFLKVNNQIKTRLGANPVPLQLA-----

HAMSTER 237 AAKGEGQLGPAERAKKVEDMMKKLWGDYRFPDANGFKSKSANSFDGKKLPRTECQLILDLP
 MCV 211 -----TSVLYMOKSGISFKDII-----
 EC 172 -----IGAEHFTGVVDLVK-----MKAUNWNDADQGVTFEYEDIPAD

HAMSTER 297 IFKVFDAIMNFRKEETAKLIEKLIDKLDSEDKKEGKPLLKAVMRRLPAGDALITOMITI
 MCV 228 -----DYCEDEKQSELA-----KALHEVILDMAIK
 EC 210 MVELANEWHQNLIESAAEAEEELMEKYLGEELTE-AEIKGALRQVRLNNEILVTCGSA

HAMSTER 357 HLPSEVTAQKYRCALLYEGPPDDBAAMGIKSCDKKGLIMMYISKMVPTSDKGRFYA----
 MCV 255 HLENELQAQKYRIPNIWKQDAESEVVGKSMACDENGLLAGVVTKIIVDKHAGSISA----
 EC 269 FKNKGVCAMLDVIDYLPSPVDVPAINGILDDGKDTPAERHASDDEPFSALAFKIATDPF

HAMSTER 413 -----FGRVFGSVVSTGLKVRIMGPNYTPGKKEELYLKPIORTILMGRYVEPIEDVPCG
 MCV 311 -----CRLESGRIKQGDLYLVG-----SKOKARAOVAIFMGAERVOVPSISAG
 EC 329 VGNLTFFRVYSGVNSG-----DTVLNSVKAARERFGRIVQMHANKREEIKVEVRAG

HAMSTER 468 NIVGLVGV-VDQFLVKTGTITTFEHAHNMRVMKFSVSPVVRVAVEAKNPADLKLIVBGLKR
 MCV 356 NICALTGLREATAGTCVSPSKILEPGEFSLTHTSEPVTHVAIEAKNTKDLKLITELRQ
 EC 380 DIAAIG--LKDVTGTGTLCDPDAPILIERMEFPEPVUSIAVEPKTKADQEKMLALGR

HAMSTER 527 LAKSDPMV-QCTIEESGEHIIAGAGELHLIECLKDLEEDHACTPIKSDPVVSYRETIVSE
 MCV 416 IGRONTYVRIEINEETGEHLISGELHIEVITDTKIGRDGGLIEVIVGEPIIVYRETITG
 EC 437 LAKEOPSFRVWTDSESNQTIAGGELHLDI-IVDRMKREFNVANVCKPQVAYRET---

HAMSTER 586 ESNVLCLSKSPNKHNLKLYMAREFPDGLAEDIDKSEVSARQELKARARYLAKRYEWDVAE
 MCV 476 TS-PEIEGKSPNKHNLKLYMAREMEESVYAAVYG-KIHEDBFKKKTNVDAATRLIEAGL
 EC 493 -----IROKVTIVEGKHAQSGSGRGQYGVHVI

HAMSTER 646 ARKIWCFGPDGTGFNILTDTIKGVOYLNEIKDSVVAGFOWATKEGAL-----CEENMRGV
 MCV 534 EREQAKVMSIYNGMIVNMGITVLDARELIIEGFKBGVKGGL-----ASERACGV
 EC 520 DMYPLEPGSNPKGYEFUNDI-KGVYIPGEYIPAVDKGIOQLKAGELAGYPVVDMGIRLH

HAMSTER 701 RFDVHDVTLHADATHRGSGQITPTARRCLYASVLTAPRLMEPIYLVEITQCPPEQVVGGIY
 MCV 589 KIKLIDATFHEDATHRGPSQIIPALIRFGVRDAVSSARPILEPMOKIYIYNTPQDYMCDAT
 EC 579 FGSYHDVDSSELA-----FKLASIAFKEGFKKAKPVLLEPIMKVEVEITPEENTGVV

HAMSTER 761 GVLRNRKG-HVFEEQVAGTFMFVVKAYLVNSESFGFTADLRSNNTGGCAFPQCQVDFHWQI
 MCV 649 REINNRGQIMDMEQ---EGDMAITKGSVMAEMFGAGAIRGATQGRCLWSVE
 EC 632 GDLSRIRGMLKGQSEVTG---VKIHAEPVLEMFYATQRLSLTKGRASYTMEFLKYDE

HAMSTER 820 LFGDPFDNSSRPSQVMAETRRKGLKEGIPALDNFLDKL
 MCV 701 -SGFERVPNEIQTKVVAQIRDRKGLKSE
 EC 689 AP-----SNVAQAVTEARGK

Abbildung 13:

Vergleich der Proteinsequenzen des EF-2 (EF-G) aus *M. vanniellii*, des EF-G aus *E. coli* und des EF-2 aus Hamster. In allen drei Sequenzen an identischen Positionen vorkommende Aminosäuren sind durch Balken über und unter den Sequenzen gekennzeichnet. Umrahmt wurden Aminosäuren, die entweder Eukaryont und Archaeobakterium oder Archaeobakterium und Eubakterium gemeinsam sind. Das durch ADP-Ribosylierung modifizierte Histidin ist durch einen Pfeil markiert.

Tabelle 5:

Ähnlichkeit der EF-G bzw. EF-2-Sequenzen basierend auf identischen Aminosäuren, berechnet mit dem Programm "Gap".

	1	2	3	4
1 <i>M. vanniellii</i>	-			
2 Hamster	35,5	-		
3 <i>E.coli</i>	32,2	30,8	-	
4 <i>Mc. luteus</i>	32,8	30,9	61,1	-

Tabelle 6 (folgende Seite):

Ähnlichkeit der EF-2-Sequenzen unter Berücksichtigung konservativer Aminosäureaustausche. Bei dieser Berechnung wurde das "Bestfit"- Programm verwendet.

	1	2	3	4
1 M. vanniellii	-			
2 Hamster	61,5	-		
3 E. coli	56,1	56,5	-	
4 Mc. luteus	58,4	53,9	76,1	-

IV. DNS-Sequenz und Analyse der an die Gene für EF-2 und EF-1 α angrenzenden Regionen

Gene für Elongationsfaktoren sind in Eubakterien eng benachbart zu Genen für andere Komponenten des Translationsapparates (Post und Nomura, 1980; Tiboni und Di Pasquale, 1987). Da deshalb mit einer ähnlichen Genorganisation in M. vanniellii gerechnet werden konnte, wurden die den Genen für EF-2 und EF-1 α benachbarten Regionen der M. vanniellii DNS sequenziert. Die DNS-Sequenz wurde auf mögliche offene Leserahmen untersucht und die gefundenen Aminosäuresequenzen wurden mit Sequenzdaten aus der NBRF- und MIPSX-Datenbank des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried verglichen. Die in Abbildung 14 gezeigten offenen Leserahmen werden im folgenden der Reihe nach, beginnend am 5'-Ende der Sequenz, besprochen.

Abbildung 14 (folgende Seiten):

Die Abbildung zeigt die gesamte, aus Methanococcus vanniellii ermittelte DNS-Sequenz sowie daraus abgeleitete Proteinsequenzen mit Ausnahme der Gene für EF-2 und EF-1 α . Ein Bereich von 1.2 kb am Ende der Sequenz (3' Terminus), der einen Teil von ORF 3 sowie ORF 4 umfasst, wurde nur einzelsträngig sequenziert. Gezeigt ist der RNS-gleiche Strang der DNS. Die Initiationsstelle des "Streptomycin"- Operons ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Umgekehrte Sequenzwiederholungen, die mit regulatorischen Funktionen in Verbindung gebracht werden, wurden unterstrichen.

→ β'

Val Asn Asn Val Val Glu Ala Ile Lys Ser Lys Met Lys Lys Leu Lys Ile Glu Glu Asn Glu
 1 GTT AAT AAC CTT GTT GAG GCA ATA AAG TCT AAA ATG AAA TTA AAA ATT GAA GAA AAT GAA

Asn Ile Asn Ser Leu Lys Ile Lys Thr Pro Ser Leu Lys Ala Leu Arg Lys Arg Leu Pro
 61 AAC ATT TTA AGT TTA AAA ATA AAA ACA CCT TCA TTG AAA GCT TTA AGA AAA AGG CTA CCG

Lys Val Arg Glu Ile His Leu Lys Gly Val Pro Asn Ile Lys Arg Val Ile Ile Arg Lys
 121 AAG GTA AGA GAA ATT CAC TTA AAG GGC GTT CCA AAT ATT AAA AGA GTA ATT ATA AGG AAA

Glu Ile Asp Glu Tyr Val Leu Tyr Ser Glu Gly Ser Asn Leu Lys Glu Val Phe Glu Ile
 181 GAA ATT GAC GAA TAT GTA TTA TAT AGT GAA GGT TCA AAC TTA AAA GAA GTT TTT GAA ATA

Asp Gly Val Asp Thr Thr Lys Thr Thr Thr Asn Asn Ile Val Glu Ile Gln Asp Val Leu
 241 GAT GGC GTT GAT ACA ACT AAA ACC ACA ACA AAT AAT ATT GTT GAA ATT CAA GAT GTT TTA

Gly Val Glu Ala Ala Arg Asn Ala Ile Ile Arg Glu Met Asp Ala Thr Leu Gly Asn Gln
 301 GGT GTT GAA CCA ATA GGT AGA CAT GGT ATT GGT GGT GAA AAA GCA TCT GTT TTA GCA AGA

Gly Leu Thr Val Asp Lys Arg His Leu Met Met Val Ala Asp Leu Met Thr Thr Asp Gly
 361 GGT CTT ACG GTT GAC AAA AGG CAC CTA ATG ATG GTA GCA GAC CTT ATG ACT ACA GAC GGA

Val Val Lys Pro Ile Gly Arg His Gly Ile Gly Gly Glu Lys Ala Ser Val Leu Ala Arg
 421 GTT GTA AAA CCA ATA GGT AGA CAT GGT ATT GGT GGT GAA AAA GCA TCT GTT TTA GCA AGA

Ala Ala Phe Glu Glu Thr Val Lys His Leu Tyr Ser Ala Ser Met Arg Gly Tyr Val Asp
 481 GCT GCA TTT GAA GAA ACC GTA AAA CAC CTC TAT TCG GCT TCA ATG AGA GGA TAC GTT GAC

Asp Leu Ser Gly Val Val Glu Asn Ile Ile Val Gly Lys Pro Ile Ser Met Gly Thr Gly
 541 GAT TTA AGT GGT GTT GGT AAT ATT ATT GTT GGA AAA CCT ATA TCT ATG GGT ACC GGG

Cys Ile Asn Val Cys Ile Lys Lys Glu Tyr Glu Glu Gly Lys Glu Leu ###
 601 TGC ATT AAC GTG TGC ATT AAA AAA GAA TAC GAA GAA GGA AAA GAA TTA TAATTATAACTTATA

AGTTATAAAATTGCTTTTTTTTATTTATTTTTGAAAAATCCCTAATTTTAGTCAATACTCTTTTTTTTGAATAATAAC
 661

TATGCAAAAGTATAAAAATAACATCTAACTATTAACCTTACTCGTATATTCATGAGGACATAAATTTCCAAAATACATAA
 745

→ Orf1
 Δ

GGGAAAAACCCCTCGGAGAATATA Met Arg Arg Arg Tyr Ser Met Asp Ile Asn Arg Ala Ile Arg
 825 ATG AGA AGG AGG TAT AGC ATG GAC ATA AAC AGA GCT ATA AGA

Val Ala Val Asp Thr Gly Asn Val Val Leu Gly Thr Lys Gln Ala Ile Lys Asn Ile Lys
 891 GTA GCA GTA GAT ACT GGA AAC GTA GTC TTA GGT ACA AAG CAG GCT ATA AAA AAC ATA AAA

His Gly Glu Gly Lys Leu Val Ile Ile Ala Gly Asn Cys Ala Lys Asp Val Lys Glu Asp
 951 CAC GGC GAA GGT AAA CTC GTT ATC ATT GCT GGT AAC TGT GCA AAA GAT GTA AAA GAA GAC

Ile Phe Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Glu Thr Pro Val Tyr Thr His Gln Val Thr Ser Ile
 1011 ATT TTT TAC TAC ACA AAG CTT TCA GAA ACT CCG GTT TAC ACC CAT CAG GTA ACA TCA ATT

Glu Leu Gly Ala Ile Cys Gly Lys Pro Phe Pro Val Ser Ala Leu Leu Val Leu Glu Pro
 1071 GAA CTT GGT GCA ATT TGT GGA AAA CCA TTT CCA GTT TCG GCA TTG TTG GTT TTA GAA CCA

Gly Asn Ser Ala Ile Leu Asn Ile Asn Asn Glu ###
 1131 GGA AAC TCG GCT ATT TTG AAC ATT AAC AAC GAA TAACCGAGGTGATGGTTA → Orf2

Met Arg Ile Lys
 ATG AGA ATT AAA

Leu Asn Thr Glu Asp Ile Met Arg Ile Ser Leu Phe Glu Lys Met Thr Gly Ala Asn Val
 1194 TTA AAC ACA GAA GAC ATC ATG AGG ATC AGT CTT TTC GAA AAG ATG ACT GGT GCC AAC GTA

Ile Asp Ser Thr Ser Asp Asp Glu Lys Ile Val Phe Val Val Lys Glu Gly Asp Ile Gly
 1254 ATT GAC AGC ACT TCA GAC GAT GAA AAG ATA GTA TTC GTC ATA AAA GAA GGT GAC ATT GGA

Ala Ala Ile Gly Lys Gly Gly Glu Asn Val Lys Asn Ala Thr Asp Lys Phe Gly Lys Lys
 1314 GCT GCA ATT GGA AAA GGC GGC GAA AAT GTA AAA AAC GCA ACC GAT AAA TTC GGA AAA AAA

Ile Asp Leu Ile Glu Tyr Ser Glu Asp Leu Lys Gln Phe Ile Lys Asn Ile Phe Ala Pro
 1374 ATA GAT TTA ATT GAA TAC TCT GAA GAT TTA AAA CAG TTT ATT AAG AAC ATT TTT GCT CCA

Ile Glu Leu Glu Asp Val Trp Val Lys Lys Phe Gly Asn Asp Leu Val Val Tyr Val Arg
 1434 ATC GAA TTA GAA GAC GTT TGG GTT AAA AAA TTC GGT AAC GAC CTC GTA GTT TAC GTT AGA

Val His Pro Arg Leu Arg Arg Ala Ile Ile Gly Asp Lys Gly Lys Asn Ile Asp Arg Ala
 1494 GTT CAC CCT AGA TTA AGG AGG GCT ATT ATC GGA GCA AAA GGG AAA AAC ATT GAT AGA GCA

Val Asp Ile Ala Gly Arg Leu Ala Gly Val Lys Asn Ile Lys Val Val Ala Gly Leu Arg
 1554 GTT GAC ATT GCA GGA AGA CTT GCA GGC GTT AAA AAT ATC AAA GTC GTT GCA GGG TTA AGA

1614 Lys Asp Ala Asp Asn Arg Pro Lys Lys Asp Glu Ile Pro Glu Lys Ala Ala Glu Ser Ser
 AAA GAC GCT GAT AAC AGG CCT AAA AAA GAT GAA ATA CCT GAA AAA GCA GCA GAA TCA TCT
 Glu Asn Val Gln Ala Glu Glu Asn Gln ### → S12
 1674 GAA AAT GTT CAA GCT GAA GAA AAC CAA TAAGGTGATTT Met Ser Gly Ser Lys Ser Pro
 ATG TCA GGA AGT AAA TCT CCA
 1734 Lys Gly Glu Phe Ala Gly Arg Lys Leu Leu Leu Lys Arg Lys Ala Thr Arg Trp Gln His
 AAA GGA GAA TTC GCA GGA AGA AAA TTA TTA TTA AAA AGA AAA GCG ACA AGA TGG CAA CAC
 1794 Tyr Lys Tyr Val Asn Arg Glu Leu Gly Leu Lys Val Lys Ala Asp Pro Leu Gly Gly Ala
 TAC AAA TAC GTT AAC AGA GAA TTA GGC TTA AAA GTA AAA GCT GAC CCG TTA GGA GGA GCT
 1854 Pro Met Gly Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Val Gly Leu Glu Ala Lys Gln Pro Asn Ser
 CCA ATG GGT AGG GGT ATT GTT GTA GAA AAA GGT GGT CTT GAA GCA AAA CAG CCA AAT TCT
 1914 Ala Ile Arg Lys Cys Val Lys Val Gln Leu Ile Lys Asn Gly Arg Val Val Thr Ala Phe
 GCG ATT AGA AAA TGT GTT AAA GTT CAG TTA ATC AAA AAT GGT AGG GTT GTA ACC GCA TTT
 1974 Ala Pro Gly Asn His Ala Ile Asn Phe Ile Asp Glu His Asp Glu Val Val Ile Glu Gly
 GCC CCA GGA AAT CAT GCT ATA AAC TTC ATT GAC GAA CCA GAT GAA GTT GTA TGG CAA GGT
 2034 Ile Gly Gly Pro Ser Gly Gln Ala Lys Gly Asp Ile Pro Gly Val Arg Tyr Lys Val Leu
 ATC GGT GGT CCA TCA GGT CAA GCT AAA GGG GAC ATT CCT GGA GTA AGA TAC AAA GTA TTA
 2094 Met Val Gly Lys Asn Ser Ile Arg Glu Leu Val Arg Gly Arg Gln Glu Lys Val Lys Arg
 ATG GTT GGT AAA Asn Ser Ile Arg Glu Leu Val Arg Gly Arg Gln Glu Lys Val Lys Arg
 ### TTTAAGAATAGATAGATTAAAAAGGGTGAAAAATTGGAATCAATTATTTGGTAAGTGGGACAGTACTTCTGTC
 2154 TAA
 2232 ACAGTTAAAGATCCAAGCTTAAATCACACATTAGCTTAAATCCAGTTTAAATCCCTCACACTGCAGGAGAAACTCAA
 → S7
 2313 GAAA Met Phe Asp Lys Asn Lys Met His Val Val Glu Arg Leu Ala Asn Lys Leu Met Ala
 ATG TTT GAT AAA AAC AAA ATG CAC GTT GTA GAA AGA TTA GCA AAT AAA TTA ATG GCT
 2373 Thr Gln Val Asn Thr Gly Lys Lys Asn Glu Val Leu Ser Ile Ile Glu Glu Ala Leu Thr
 ACG CAA GTA AAC ACT GGG AAA AAA AAC GAA GTT TTG TCA ATA ATT GAA GAA GCT TTA ACT
 2433 Ile Val Glu Asn Arg Thr Lys Glu Asn Pro Ile Gln Val Val Val Asp Ala Leu Glu Asn
 ATT GTT GAA AAT AGA ACT AAA GAA AAC CCA ATT CAA GTT GTA GTT GAT GCT TTA GAA AAT
 2493 Ser Gly Pro Arg Glu Glu Thr Thr Arg Ile Ser Tyr Gly Gly Ile Ala Phe Leu Gln Ser
 TCA GGG CCT AGG GAA GAA ACT ACA AGA ATT TCA TAC GGT GGT ATC GCA TTC CTA CAG TCA
 2553 Val Asp Val Ser Pro Ser Arg Arg Leu Asp Thr Ala Phe Arg Asn Ile Ser Leu Gly Ala
 GTA GAC GTT TCG CCT TCA AGA AGA CTC GAT ACT GCA TTT AGA AAC ATT TCA CTC GGT GCT
 2613 Ser Gln Gly Ala His Lys Ser Lys Lys Ser Ile Ala Gln Cys Leu Ala Asp Glu Leu Val
 TCA CAG GGT GCC CAC AAA AGC AAA AAA TCT ATT GCT CAG TGC TTA GCA GAT GAA TTA GTT
 2673 Ala Ala Ser Lys Ala Asp Met Gln Lys Ser Phe Ala Val Lys Lys Lys Glu Glu Lys Glu
 GCA GCT TCA AAA GCA GAT ATG CAA AAA AGC TTT GCA GTT AAG AAA AAA GAA GAA AAA GAA
 2733 Arg Val Ala Gln Ser Ala Arg ### AACCATACATTTTATATTCTTTATACATAACTCTATATCATAAA
 AGA GTT GCA CAA TCT GCA AGA TAA → EF-2
 2804 ATGATACTAGAGTATACATATTGTGAAGTCTCAAAAAAATAAAGAGTGAAATATG Met
 ### ACGACCACCATAAAATATATATACCTTTTCTACTACAC
 TAA
 5083 TTATTACACTTACGGTTGAGTCTAAAACCTGAATCAATCTAAATAAATGAAAAACATCAATCTAAAACCTATTATGG
 → EF-1
 5163 AGGAATGATCATG Met ### TTTAGCTTAAGTCCCATTCTTTTATTTAAACACGG
 TAA
 → S10
 6497 AAAAGACAGGAATATT Met Gln Lys Ala Arg Ile Lys Leu Ser Ser Thr Lys His Glu Glu Leu
 ATG CAA AAA GCA AGA ATT AAA CTA TCA AGT ACT AAA CAC GAA GAA TTA
 6561 Asp Ser Val Cys Asn Gln Ile Lys Ala Ile Ala Glu Lys Thr Gly Val Asp Met Ala Gly
 GAC AGC GTA TGC AAC CAG ATA AAA GCA ATT GCT GAA AAA ACT GGT GTA GAT ATG GCG GGA
 6621 Pro Ile Pro Leu Pro Thr Lys Ser Leu Lys Ile Thr Thr Arg Lys Ser Thr Asp Gly Glu
 CCA ATT CCA TTA CCA ACA AAA TCA TTG AAA ATC ACG ACA AGA AAA TCA ACT GAC GGC GAA

1. Gen für die Untereinheit β' der RNS-Polymerase

Am 5'-Ende des sequenzierten Bereiches aus dem Genom von *M. vanniellii* wurde der C-terminale Teil eines möglichen offenen Leserahmens gefunden. Durch Vergleich mit den Datenbanken NBRF und MIPSX konnte dieser zum N-Terminus hin unvollständige ORF dem C-Terminus der RNS-Polymerase Untereinheit β' aus *E. coli* (Ovchinnikov et al., 1982) bzw. der RNS-Polymerase II aus *Saccharomyces cerevisiae* (Allison et al., 1985) zugeordnet werden.

```

M.v.      1 .....VNNVVEAIKSKMK.....LKIEENENILSLKIKTPSLKA 34
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
S.c. 1201 AMNDKDLTMGQVGERIKQTFKNDLFVIWSEDNDEKLIIRCRVVRPKSLDA 1250
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
          35 .....LRKRLPKVRE.IHLKGVPNIKRVIIRK.....E 61
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
1251 ETEAEEDHMLKKIENTMLENITLRGVENIERVVMKYDRKVPSPPTGEYVK 1300
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
          62 IDEYVLYSEGSNLKEVFEIDGVDTTKTTNNIVEIQDVLGVEAARNAIIR 111
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
1301 EPEWLETGDNLSSEMTVPGIDPTRIYTNFSFIDIMEVLGIEAGRAALYK 1350
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
          112 EMDATLGNQGLTVDKRHLMMVADLMTTDGVVKPIGRHGIGEKASVLASA 161
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
1351 EVYNVIASDGSYVNYRHMALLVDVMTTQGGTSTVRHGFNRSNTGALMRC 1400
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
          162 AFEETVKHLYSASMRGYVDDLSGVVENIIVGKPISMGTGCINVCIKKEYE 211
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
1401 SFREETVEILFEAGASAEELDDCRGVSENVILGQMAPIGTGAFDVMIDEESL 1450
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
          212 EGKEL..... 216
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
1451 VKYMPEQKITEIEDGQDGGVTPYSNESGLVNADLDVKDELDFSPLVDSGS 1500
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

```

Abbildung 15:

Homologisierung der RNS-Polymerase II aus *Saccharomyces cerevisiae* und des offenen Leserahmens (RNS-Polymerase β') aus *M. vanniellii*.

Wie der Abbildung 15 entnommen werden kann, zeigt die eukaryotische Polymerase hohe Homologie zu der Fragment-Sequenz aus *M. vanniellii*.

Wichtig für die Beurteilung einer im Computer gefundenen Ähnlichkeit ist dabei die Berücksichtigung der in die Aminosäuresequenzen eingeführten Lücken ("Gaps"). Ist die Zahl der Lücken gering, wie im vorliegenden Fall, so kann dies als ein guter Hinweis auf die Signifikanz des Sequenzvergleiches betrachtet werden (P. Palm,

persönliche Mitteilung). Zufällige Ähnlichkeiten zwischen verglichenen Proteinen betragen bis ca. 20 %. Im Folgenden wurde davon ausgegangen, daß Ähnlichkeiten mit mehr als 25 % identischen Aminosäuren als hochsignifikant angesehen werden können.

Die Nomenklatur wurde mit Ausnahme der Gene für EF-1 α (EF-Tu) und EF-2 (EF-G) entsprechend der für *E. coli* gültigen Benennungen vorgenommen. Die ansequenzierte Untereinheit der RNS-Polymerase aus *M. vannielii* wird also als β' -Untereinheit bezeichnet.

Ähnlich wie schon für EF-1 α (EF-Tu) und EF-2 (EF-G) beobachtet, weist auch die β' -Untereinheit der RNS-Polymerase eine höhere Ähnlichkeit zum homologen Protein aus Eukaryonten (36 % Identität zum Protein aus Hefe) als aus Eubakterien (28 % Identität mit *E. coli*) auf. 3' zum Polymerase-Gen werden zwei invertierte Sequenzwiederholungen gefunden, die möglicherweise für die Termination der Transkription des Gens von Bedeutung sind. Ergebnisse, die mit dem RNS-Polymeraseoperon von *Sulfolobus* erhalten wurden (F. Gropp, persönliche Mitteilung), bestätigen diese Annahme. Für diesen Organismus wurde über S1-Mapping die Terminationsstelle des Polymeraseoperons nach der β' -Untereinheit (in *Sulfolobus* Untereinheit C) gefunden.

2. ORF 1 und ORF 2

3' in einem Abstand von 197 Nukleotiden folgt auf das Gen für die RNS-Polymerase ein offener Leserahmen, der mit ORF 1 bezeichnet wurde. Ein weiterer offener Leserahmen, der nur 18 Nukleotide nach dem Stopp-Kodon von ORF 1 beginnt, wurde ORF 2 genannt. Beide offene Leserahmen codieren für basische Proteine. Eine Datenbanksuche lieferte für keinen der beiden Leserahmen eine signifikante Homologie zu einem eubakteriellen Protein.

Der ORF 1 konnte jedoch mit dem ribosomalen Protein L30 der Ratte homologisiert werden (Abbildung 16), wobei sich mit 36,8 % identischen Aminosäuren eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen ergab. Für ORF 2 wurde zu keiner der bekannten Proteinsequenzen signifikante Homologie gefunden.

identischen Aminosäuren eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen ergab. Für ORF 2 wurde zu keiner der bekannten Proteinsequenzen signifikante Homologie gefunden.

```

R.n.  1 VAAKTKKSLESINSRLQLVMKSGKYVLGYKQTLKMIROGKAKLVILANN 50
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
M.v.  1 ....MRRRYSMDINRAIRVAVDGTGNVVLGKQAIKNIKHGEGKLVIIAGN 46
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
      51 CPALRKSEIEYYAMLAKTGVHHYSGNNIELGTACGKYRVCTLAIIDPGD 100
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
      47 CAKDVKEDIFYYTKLSETPVYTHQVTSIELGAICGKPPFVSALLVLEPGN 96
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
      101 SDIIRSMPEQTGEK 114
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
      97 SAILNINNE*.... 106
  
```

Abbildung 16:

Homologisierung des Genproduktes von ORF 1 mit dem ribosomalen Protein L30 aus *Rattus norvegicus* (Nakanishi et al., 1985).

3. Methanococcus Protein mit Homologie zum ribosomalen Protein S12 aus Eubakterien

In einem Abstand von nur 12 Nukleotiden folgt auf ORF 2 ein offener Leserahmen, der durch Datenbankvergleich als *Methanococcus*-Homologes zum ribosomalen Protein S12 aus *E. coli* identifiziert werden konnte (Abbildung 17).

Die Sequenz aus *M. vannielii* zeigt hohe Übereinstimmung mit den S12-Proteinen aus Eubakterien (Tabelle 7). Die Ähnlichkeit beträgt zwischen 29.1 % und 35.9 %; die Gene aus Eubakterien weisen untereinander mindestens 64 % Identität auf. S12 gehört damit zu den am besten konservierten ribosomalen Proteinen (Wittmann-Liebold, 1987), was auf eine essentielle Funktion dieses Proteins hindeutet.

Abbildung 17 (umseitig):

Alignment der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins S12 aus *E. coli* (EC) (Post und Nomura, 1980) und aus den Chloroplasten von *Euglena gracilis*

```

MCV      1  MSGSKSPKGEFAGRKLLLRKATIRWQHYKYVNRELGLVKADPTGGAPMGRGIVVEKVGL
EC        1  -----ATVNQLVRKPRARKVAKSNVPALEACPQKRGGVCTRVYTT
EUGL      1  -----PTLEHLTRSPRKIKRRTKSPALKGCPQKRAICMRVYTT
MARCH     1  -----MPTIQQLIRNKRQPIENRTKSPALKGCPQRRGVCCTRVYTT
NIC        1  -----MPTIKQLIRNTRQPIRNVTKSPALRGCPQRRGTCTRVYTI

```

```

MCV      61  EAKQPNSAIRKCVKVLIKNGRVVTAFAFGNHAINFIDEHDEVVIEGIGGPSGQAKGDIP
EC        40  TPKKPNSALRKVCVRML-TNGFEVTSYIGGEGHNLQEHSVILI-----RGGRVKDLP
EUGL      40  TPKKPNSALRKVTRVRL-SSGLEVTAYIPGIGHNLQEHSVVLI-----RGGRVKDLP
MARCH     41  TPKKPNSALRKTIARVRL-TSGFEITAYIPGIGHNLQEHSVVLV-----RGGRVKDLP
NIC        41  TPKKPNSALRKVARVRL-TSGFEITAYIPGIGHNLQEHSVVLV-----RGGRVKDLP

```

```

MCV      121  GVRVYKVLVVGKNSIRELVR---GRQEKVRR
EC        91  GVRVYHTVRGALDCSGVKDRKQARSKYGVKRPKA
EUGL      91  GVRVYHVIRGCLDAASVKNRKNARSKYGVKPKPK
MARCH     92  GVRVYHIIRGTLDVGVKDRQGRSKYGVKSK
NIC        92  GVRVYHIVRGTLDAVGVKDRQGRSKYGVKPK

```

Tabelle 7:

Ähnlichkeit der S12-Proteine aus *M. vannielii* und Eubakterien. Zusätzlich zu den in Abbildung 17 gezeigten Sequenzen wurden diejenigen von S12 aus *Micrococcus* (Mc.) *luteus* (Ohama et al., 1987), sowie das *tko*-Genprodukt aus *Drosophila melanogaster* (Royden et al., 1987) einbezogen.

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>M. vannielii</i>	-						
2 <i>E. coli</i>	29,1	-					
3 <i>Mc. luteus</i>	31,4	69,9	-				
4 <i>E. gracilis</i>	35,9	69,1	64,2	-			
5 <i>Ma. polymorpha</i>	32,6	70,5	73,2	74,6	-		
6 <i>N. tabacum</i>	32,2	71,1	72,1	73,6	91,8	-	
7 <i>tko</i> -Protein	25.4	42.7	48.6	46.3	46.8	44.1	-

Bemerkenswert ist auch die hohe Ähnlichkeit des *tko*-Genproduktes aus *D. melanogaster* mit S12. Mutationen im *tko*-Genort führen zu einer Verhaltensstörung bei *Drosophila*. Nach einer Annahme von Royden et al. (1987) handelt es sich dabei um ein mitochondriales ribosomales Protein mit der Funktion von S12. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß das *tko*-Gen von *D. melanogaster* aus dem Gen für S12 hervorging und mittlerweile andere Funktionen übernommen hat.

4. Methanococcus Protein mit Homologie zum ribosomalen Protein S7 aus Eubakterien

Ein zwischen den Genen für das ribosomale Protein S12 und EF-2 (EF-G) gelegener offener Leserahmen konnte durch Datenbankvergleich als Homologes zum ribosomalen Protein S7 aus *E. coli* identifiziert werden (Tabelle 8).

Tabelle 8:

Ähnlichkeit des ribosomalen Proteins S7 aus *E. coli* (Post und Nomura, 1980), *Micrococcus* (Mc.) *luteus* (Ohama et al., 1987), den Chloroplasten von *Euglena* (*E.*) *gracilis* (Montandon und Stutz, 1984), *Marchantia* (Ma.) *polymorpha* (Ohyama et al., 1986), *Nicotiana* (N.) *tabacum* (Shinozaki et al., 1986) und des S7-Homologen aus *M. vannieli*.

	1	2	3	4	5	6
1 <i>M. vannieli</i>	-					
2 <i>E. coli</i>	33,1	-				
3 <i>Mc. luteus</i>	23,4	53,9	-			
4 <i>E. gracilis</i>	25,7	40,0	41,9	-		
5 <i>Ma. polymorpha</i>	26,4	43,1	42,6	44,2	-	
6 <i>N. tabacum</i>	27,9	43,1	41,3	40,9	77,4	-

Dieses Protein ist insgesamt wesentlich weniger gut konserviert als S12. Das ist insofern erstaunlich, als S7 direkt mit der 16 S rRNS assoziiert ist (Nomura und Held, 1974) und somit eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der Ribosomen spielt.

5. Homologes zum ribosomalen Protein S10 aus Eubakterien

Die dem tuf-Gen stromabwärts folgende DNS-Sequenz codiert für ein weiteres ribosomales Protein. Die erhaltene Aminosäuresequenz konnte mit dem ribosomalen Protein S10 aus *E. coli* und *Mycoplasma* homologisiert werden (Abbildung 18).

EC	1	MONQRIIRIRKAFDRLIDQATAPIVETAKRTCAQVRGPIPLPTRKERFIVLIS-PHVNK
MCAP	1	MAENKMRIRIKGYDHAIVDQSITKIIQAPEGTGAKVRGPIPLPTEKQVITILRA-VHKYK
MCV	1	--MQKARIKLSSTKHEELDVCNOIKAINERTGVDMAGPIPLPTKSLKITTRKSTDGEGS

EC	60	DARDQYEIRIRILRLVDIIEPTERTVDALMRDLAAGVDVQISLG
SMCAP	60	DSREQFEMRIIRLLEILNPTAATMDVLKRVQLPSGVDIEIKL
MCV	59	SSFDRWTMRVIRKVIDI-EADERIMKHIMKVKNS

Abbildung 18:

Vergleich der Aminosäuresequenz aus *M. vannielii* (Mcv) mit der Sequenz des ribosomalen Proteins S10 aus *E. coli* (EC) (Yaguchi et al., 1980) und *Mycoplasma capricolum* (MCAP) (Ohkubo et al., 1987).

Im Sequenzvergleich fällt besonders das Motiv Gly-Ile-Pro-Leu-Pro-Thr ins Auge, das in allen drei Organismen konserviert ist, was auf eine wesentliche Funktion dieser Domäne des S10-Proteins hinweist.

Tabelle 9 zeigt die Ähnlichkeit des Proteins aus *M. vannielii* zu S10 aus Eubakterien.

Tabelle 9 (umseitig):

Ähnlichkeit der S10-Proteine aus Eubakterien und *M. vannielii*.

	1	2	3
1 <i>M. vanniellii</i>	-		
2 <i>E. coli</i>	32,2	-	
3 <i>M. capricolum</i>	32,2	49,0	-

6. Sequenzen stromabwärts des Gens für S10

An den offenen Leserahmen für S10 schließt sich ein längerer nicht codierender Bereich an. Darauf folgen zwei weitere, hypothetische offene Leserahmen, ORF 3 und ORF 4. Die DNS-Sequenz in diesem Bereich des Genoms liegt teilweise nur einzelsträngig vor. Für ORF 3 und ORF 4 konnte im Vergleich mit Datenbanken keine signifikante Ähnlichkeit zu einem eubakteriellen oder eukaryotischen Protein gefunden werden. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 6.2 bzw. 5.2. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß ORF 3 und ORF 4 für ribosomale Proteine codieren. Die Frage ob, und wenn ja, welche Funktion diesen hypothetischen offenen Leserahmen in *M. vanniellii* zukommt, bleibt daher offen.

Zwischen dem Gen für S10 und ORF 3 liegt ein nicht codierender Abschnitt von 535 Nukleotiden, während zwischen den vorangegangenen Genen Abstände von maximal 200 Nukleotiden gefunden werden. Diese Region hat einen GC-Gehalt von lediglich 28 %, während der Wert des Gesamtgenoms 31.1 % ist (Balch et al., 1979). Innerhalb der untersuchten offenen Leserahmen liegt der GC-Anteil zwischen 34 und 40 % (siehe Tabelle 10). Muto und Osawa (1987) konnten zeigen, daß bei Organismen mit niedrigem GC-Gehalt dieser in codierenden Bereichen höher ist als in intergenen Regionen. Für ORF 3 und ORF 4 gibt das einen Hinweis auf die Funktionalität dieser Leserahmen. Der große Abstand zwischen dem Gen für S10 und ORF 3 deutet darauf hin, daß diese Gene wohl nicht gemeinsam

transkribiert werden.

Tabelle 10:

GC-Gehalt der untersuchten offenen Leserahmen, Molekulargewicht (MW) und isoelektrischer Punkt (pI) der daraus abgeleiteten Proteine

	GC	MW	pI
ORF 1	40.0	11482	10.1
ORF 2	36.4	19266	7,5
S12	38.3	16068	11,1
S7	35.4	16076	10,5
EF-2	37.6	80161	5,4
EF-1 α	39.5	46467	7,0
S10	35.5	10236	10,5
ORF 3	35.1	15288	6.2
ORF 4	34.9	10860	5.1

V. Untersuchung der Operonstruktur der beschriebenen Gene

1. "Northernblot"- Experimente

Die Organisation der *Methanococcus* Gene für S12, S7, EF-2 und EF-1 α ähnelt derjenigen des sogenannten Streptomycin-Operons von *E. coli*. In diesem Operon liegen das Gen für das namengebende ribosomale Protein S12 zusammen mit den Genen für S7, EF-G und EF-Tu in einer Transkriptionseinheit vor (Nomura et al., 1984). Diese Tatsache und auch die Existenz von nur kurzen intercistronischen Sequenzen weisen darauf hin, daß die Gene für ribosomale Proteine in Archaeobakterien, ähnlich wie die in Eubakterien, in Operonen organisiert sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurden in "Northernblot"-Experimenten Transkripte des sequenzier-ten Bereichs aus dem Genom von *M. vannielii* untersucht (Abbildung

in Operonen organisiert sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurden in "Northernblot"-Experimenten Transkripte des sequenzier-ten Bereichs aus dem Genom von *M. vanniellii* untersucht (Abbildung 19). Als Hybridisierungsproben wurden die in Abbildung 10 c gekennzeichneten Bereiche der klonierten DNS-Abschnitte einge-
setzt.

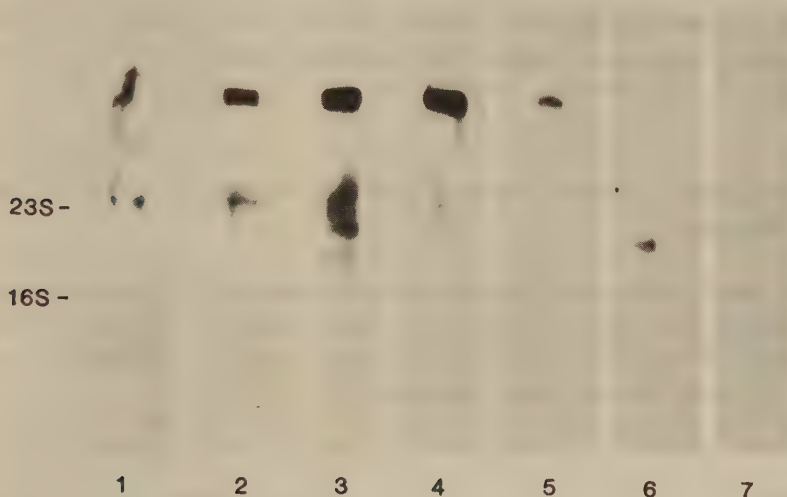


Abbildung 19:

"Northernblot"-Analyse des sequenzierten Abschnittes aus dem *M. vanniellii* Chromosom. Die Numerierung der Spuren bezieht sich auf den jeweils zur Hybridisierung eingesetzten Abschnitt der DNS (vergleiche Abbildung 10c). Als Größenstandard diente 16S- (1.6 kb) bzw. 23S (3.0 kb) rRNS von *M. vanniellii*.

Mit den Proben 2, 3, 4, 5, und 6 (siehe Abbildung 10c) konnte jeweils ein Transkript von 6-6.5 kb Größe identifiziert werden. Fragment 6, das nur ein kurzes Stück des S10-Gens enthält, lieferte ein sehr schwaches Signal. Mit den Fragmenten 1 und 7 wurde kein Signal im entsprechenden Größenbereich erhalten. Das Signal in Spur 1 ist nicht spezifisch, sondern beruht lediglich auf starker Hintergrundschwärzung. In einigen Fällen (Spur 1, 2) liefert 16S- bzw. 23S rRNS ein zusätzliches Signal. Dieses Ergebnis läßt folgende Rückschlüsse auf die Expression der

untersuchten Gene zu:

- (i) ORF 1 und ORF 2 sowie die Gene für *Methanococcus* S12, S7, EF-2, EF-1 α und S10 werden gemeinsam transkribiert.
- (ii) Aus dem Fehlen von Signalen bei Hybridisierung mit Fragment 1 und 7 kann geschlossen werden, daß die Menge an gebildetem Transkript zumindest wesentlich geringer ist als diejenige des Transkripts für das Streptomycin-Operon.

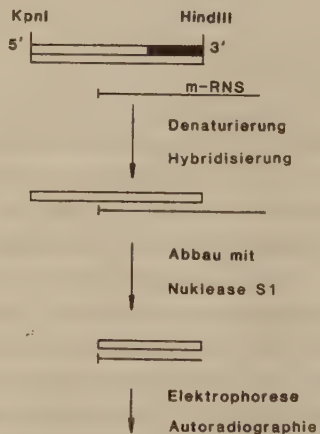
2. Bestimmung von Initiationsstelle und Terminationsstelle der Transkription

Durch "Northernblotting" kann Größe und Lage des Transkriptes nur näherungsweise bestimmt werden. Eine genaue Ermittlung von Initiationsstelle und Terminationsstelle der Transkription kann über Nuklease S1 Kartierung erfolgen.

Abbildung 20:

Die Vorgehensweise bei der Bestimmung der Initiationsstelle der Transkription des Operons ist in der nebenstehenden Abbildung dargestellt.

Das gezeigte KpnI/HindIII-Fragment stammt aus dem 5'-Ende des Operons. Markiert wurde die HindIII-Spaltstelle. Der ausgefüllte Balken kennzeichnet das 5'-Ende von ORF 1.



Das Resultat der Kartierungs-Experimente mit Nuklease S1 zeigt Abbildung 21.

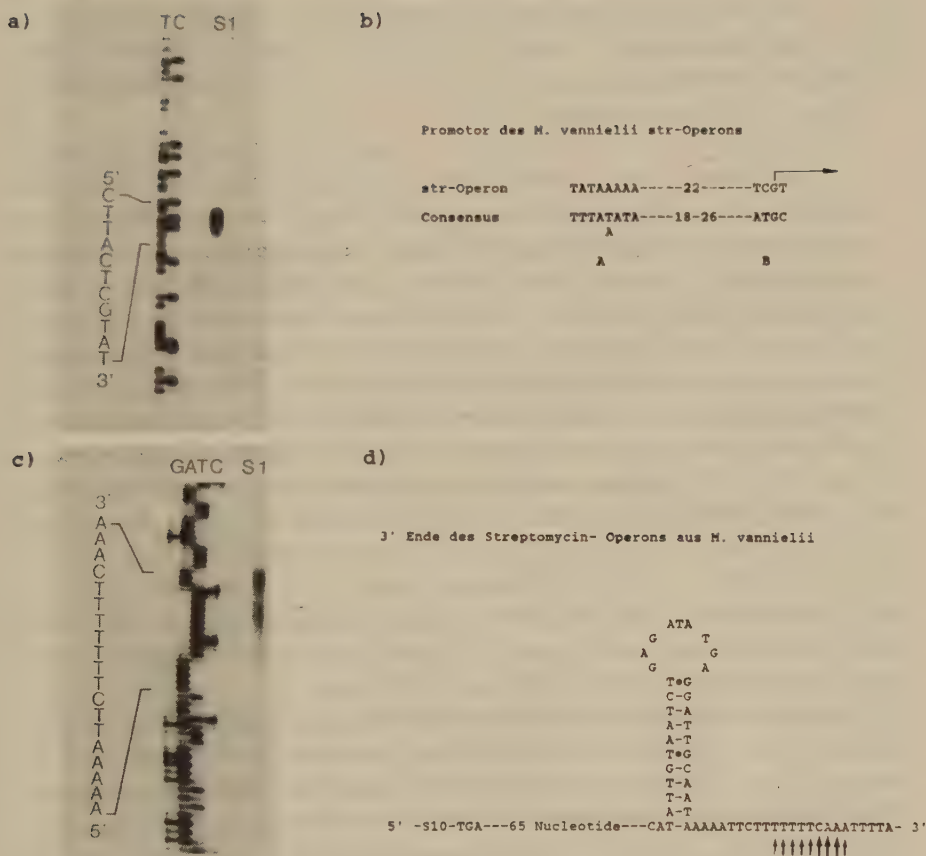


Abbildung 21:

a) Autoradiogramm von DNS/RNS-Hybriden aus dem Bereich der Transkriptionsinitiation nach Behandlung mit Nuklease S1.

Spur T und C: basenspezifische Sequenzreaktionen

Spur S1: DNS/RNS-Hybrid

b) Vergleich der gefundenen Promotor-Region mit dem archaebakteriellen Promotor-Consensus (Thomm und Wich, 1988). Die Startstelle der Transkription wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet.

c) Autoradiogramm von DNS/RNS-Hybriden aus dem Bereich der Transkriptionsinitiation nach Behandlung mit Nuklease S1.

Spur G, A, T, C: basenspezifische Sequenzreaktionen,
 Spur S1: DNS/RNS-Hybride.

d) Mögliche Sekundärstruktur im Terminatorbereich der DNS. Terminationsstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In einem Abstand von 62 Nukleotiden stromauf vom Startkodon des offenen Leserahmens ORF 1 konnte die Transkriptionsstartstelle kartiert werden. Diese liegt in einem Sequenzmotiv, das mit dem von Wich et al. (1986) postulierten archaebakteriellen Promotor-Consensus in Einklang steht. Fünf von acht Basen der Box A sind konserviert. Der Abstand zu Box B beträgt 22 Basen, im Consensus sind es zwischen 18 und 26 Basen. Box B zeigt allerdings nur geringe Ähnlichkeit zur Consensussequenz; nur das G an Position 3 ist konserviert. Es scheint, daß die Konservierung von Box B bei Genen, die für Proteine codieren, im Gegensatz zu der Situation bei Genen für stabile RNS, nur wenig ausgeprägt ist, was auch durch neue Daten von Thomm und Wich (1988) belegt wird.

Zur Untersuchung der Termination der Transkription wurde eine EcoRI-Spaltstelle nahe dem 3'-Ende des offenen Leserahmens für S10 markiert.

Die Termination erfolgt, wie aus Abbildung 21 c und d hervorgeht, in einem dT-reichen DNS-Abschnitt an mehreren Positionen der Sequenz. Der Terminationsregion geht eine invertierte Sequenzwiederholung voraus, welche die in Abbildung 21 d gezeigte Struktur ausbilden kann.

Eine sehr ähnliche Struktur wurde bei rho-unabhängigen Terminatoren aus E. coli-Phagen (Holmes et al., 1983) und beim Terminator des Methyl-CoM-Reduktase Gens aus Methanococcus voltae gefunden (Müller et al., 1985). Auch dort läßt sich im Abstand von 60-70 Basen nach dem Strukturgenbereich eine "Bäumchenstruktur" ausbilden, auf die eine dT-reiche Region folgt, in der Termination stattfindet.

Terminatoren aus stabilen RNS-Genen von Archaeobakterien weisen eine von diesem Bild abweichende Struktur auf. Von Wich et al. (1986) wurden als Terminatoren von tRNS-Genen AT-reiche Regionen gefunden, die direkt auf das jeweilige Gen folgten. Es kann

daher nicht ausgeschlossen werden, daß Gene für stabile RNS in Archaeobakterien anders terminiert werden als Gene, die für Proteine codieren.

3. Initiation der Translation

Das 3'-Ende der 16S rRNS von *M. vannielii* enthält ebenso wie das der anderen Archaeobakterien und der Eubakterien die Sequenz 3'CCUCCACU (Jarsch und Böck, 1985). Von ihr wird angenommen, daß sie mit komplementären Sequenzen der mRNS paart und damit die Translation initiiert (Shine und Dalgarno, 1974). Untersucht man Sequenzen, die den Initiationskodons von Genen aus *M. vannielii* direkt vorausgehen, so findet man Sequenzmotive, die als Shine-Dalgarno-Sequenzen dienen können. Diese Regionen proximal zu den einzelnen Genen sind in Abbildung 22 dargestellt.

16 S rRNS	3'-CCTCCACTA- -5'
ORF 1	GGAAAAACCTCTGGAGAATATAATGAG
ORF 2	ACGAATAACCGAGGTGATGGTTAATGAG
S 12	AAGAAAACCAATAAGGTGATTTTATGTC
S 7	CACTGCAGGAAGAAACTCAAAGAAAATGTT
EF-2 (1)	CTCAAAAAAATAAAAGAGTGAAAATATGGG
EG-2 (2)	TGAAAATATGGGAAGACGAGCAAAAATGGT
EF-2 (3)	AATGGTTGAAAAGGTTAAATCCTTAATGGA
EF-1α	TAAAATCTATTATGGAGGAATGATCATGGC
S 10	AAAACACGGAAGAGAGGAATATTATGCA
ORF 3	CGCTGGAGAAATTTCTACCCCACTGATGTA

Abbildung 22:

Sequenzmotive proximal zum Startkodon. Die Sequenzen sind jeweils auf das Startkodon (ATG) ausgerichtet.

Die Sequenz, die ideal mit dem 3'-Ende der 16S rRNS hybridisieren würde, ist GGAGGTGAT. Als Consensus von 10 möglichen Shine-Dalgarno-Sequenzen der untersuchten Gene kann $G_4G_6A_9G_{10}G_6$ bestimmt werden.

Die Ähnlichkeit zur ideal hybridisierenden Sequenz bekräftigt die von Hamilton und Reeve (1985) getroffene Annahme, daß die Initiation der Translation in Archaeobakterien wie bei den Eubakterien durch mRNS/16S -RNS-Hybridisierung koordiniert wird.

4. Kodonauswahl in M. vannielii

Es ist zu erwarten, daß der Kodon-Gebrauch in M. vannielii den niedrigen GC-Gehalt des Organismus (31 %; Balch et al., 1977) widerspiegelt. Die Kodonauswahl der Gene für die Proteine S12, S7, EF-G, und EF-Tu aus E. coli, Micrococcus (Mc) luteus und M. vannielii sind in Tabelle 11 verglichen.

In der Gesamttendenz entspricht die Benutzung der Basentriplets dem erwarteten Bild, nämlich daß eine Bevorzugung von A und T in der Basenposition zwei und drei vorherrscht, während sich mit zunehmendem GC-Reichtum das Verhältnis umkehrt. Abweichend davon werden allerdings für die Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Asparagin die GC-reicheren Triplets in Methanococcus bevorzugt.

Tabelle 11 (folgende Seite):

Beispiele für die Kodonauswahl in M. vannielii (31 % GC), E. coli (51 % GC) und Mc. luteus (74 % GC; Ohama et al., 1987).

Kodon	<i>M. vanniellii</i>	<i>E. coli</i>	<i>Mc. luteus</i>
Phe (UUU)	20	7	0
Phe (UUC)	23	37	43
Val (GUU)	82	70	1
Val (GUC)	3	1	67
Val (GUA)	40	39	0
Val (GUG)	2	12	74
Pro (CCU)	22	6	5
Pro (CCC)	2	2	27
Pro (CCA)	39	5	0
Pro (CCG)	4	52	35
Ala (GCU)	49	48	6
Ala (GCC)	3	6	83
Ala (GCA)	67	25	3
Ala (GCG)	4	35	21
Tyr (AUA)	5	8	0
Tyr (UAC)	20	28	37
His (CAU)	1	7	1
His (CAC)	30	24	30
Asn (AAU)	16	2	3
Asn (AAC)	42	41	43
Lys (AAA)	104	69	0
Lys (AAG)	18	20	89
Glu (GAA)	113	90	0
Glu (GAG)	5	21	113
Cys (UGU)	11	4	0
Cys (UGC)	3	6	6
Gly (GGU)	62	76	15
Gly (GGC)	8	38	100
Gly (GGA)	47	2	0
Gly (GGG)	4	2	2

5. Vergleich der Organisation der untersuchten Gene mit derjenigen in E. coli

Die meisten in dieser Arbeit untersuchten offenen Leserahmen aus *M. vannielii* konnten Proteinen aus *E. coli* als homolog zugeordnet werden. Abbildung 23 zeigt, daß auch die entsprechenden Gene vielfach in gleicher Weise organisiert sind.

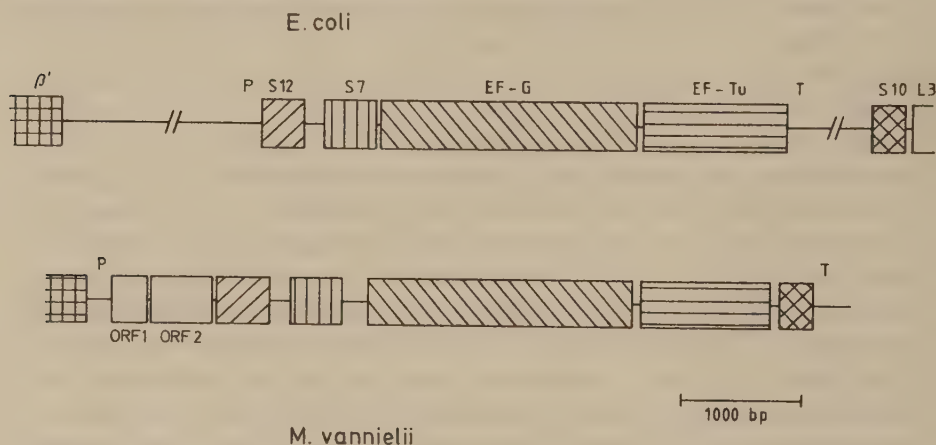


Abbildung 23:

Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Gene mit den homologen Genen aus *E. coli*. Homologe Gene sind durch gleiche Schraffur gekennzeichnet.

In *E. coli* liegen die Gene für die ribosomalen Proteine S12 (rpsL) und S7 (rpsG) sowie für die Elongationsfaktoren EF-Tu (tufA) und EFG (fus) auf einer Transkriptionseinheit. Dieses Operon wird als Streptomycin-Operon bezeichnet und kartiert bei Minute 73 auf dem *E. coli* Chromosom (Post und Nomura, 1980). Die Abfolge der Gene für S12, S7, EF-G, EF-Tu in *Methanococcus* ist identisch.

Das Gen, welches für das ribosomale Protein S10 codiert, liegt in *E. coli* 15 kb von tufA entfernt und bildet den Beginn eines neuen Operons. Das S10 Gen in *M. vannielii* folgt dagegen in einem Abstand von nur 56 Nukleotiden auf das Gen für EF-1 α und wird, im

Gegensatz zur Situation in *E. coli*, mit diesem Gen cotranskribiert.

Weiterhin findet man im *M. vanielii* Streptomycin-Operon Gene, mit ORF 1 und ORF 2 bezeichnet, die kein Äquivalent in *E. coli* besitzen. Beide Gene codieren für basische Proteine und werden zusammen mit Genen für ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren transkribiert. Berücksichtigt man außerdem die Homologie des ORF 1 Genprodukts zu L30 aus der Ratte, so liegt der Schluß nahe, daß ORF 1 und ORF 2 für zwei ribosomale Proteine codieren, die *M. vanielii* zusätzlich zu den in *E. coli* gefundenen ribosomalen Proteinen besitzt.

Die Herkunft dieser "zusätzlichen" Gene kann auf mindestens drei Arten gedeutet werden:

- Sie können in den Eubakterien nach deren Abspaltung von den Archaeobakterien verlorengegangen sein;
- Das Einwandern von Genen für zusätzliche ribosomale Proteine über horizontalen Gentransfer wäre denkbar;
- Eine Vermehrung der Zahl ribosomaler Proteine kann über Gen-duplikation erfolgt sein.

Bei Minute 90 auf dem Chromosom, also 16 min entfernt vom str-Operon, kartiert in *E. coli* das Gen für die β' - Untereinheit der RNS-Polymerase. In *Methanococcus* beträgt der Abstand zwischen Polymerase-Gen und "Streptomycin-Operon" lediglich 197 Nukleotide. Im Verlauf der Evolution hat also eine Umorganisation dieser Gene stattgefunden, wobei die Zusammensetzung der einzelnen Transkriptions-Einheiten in Eu- und Archaeobakterien weitgehend konserviert blieb.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Elongationsfaktoren aus *M. vanielii* zu denen aus Eukaryonten, erscheint es sinnvoll, die von Klink (1985) vorgeschlagenen Nomenklatur EF-1a bzw. EF-2 für diese Proteine beizubehalten.

VI. Versuche zur ADP-Ribosylierbarkeit von *Methanococcus* EF-2 nach Umklonierung des Gens in Hefe

Die Inaktivierung von EF-2 aus Eukaryonten und Archaeobakterien durch Diphtherietoxin erfolgt über Mono-ADP-Ribosylierung dieses Moleküls (Honjo et al., 1968; Kessel und Klink, 1980). Der Angriff des Diphtherietoxins erfolgt an einer definierten Stelle des EF-2-Moleküls, an der in Eukaryonten wie in Archaeobakterien ein Histidinmolekül durch Diphthamid ersetzt ist (Gehrmann et al., 1985). Diphthamid ist ein modifiziertes Histidin, das von van Ness et al. (1980) als 2-3-carboxyamido 3-(trimethylamino)-propyl-Histidin identifiziert werden konnte.

Die Ähnlichkeit der Sequenzen von eukaryotischem und archaeobakteriellem Elongationsfaktor gibt Grund zu der Annahme, daß die Modifikation des Histidins in EF-2 über verwandte Enzymsysteme erfolgt. Daher sollte geprüft werden, ob EF-2 aus *M. vannielii* nach Expression des Gens in *Saccharomyces cerevisiae* ADP-ribosyliert werden kann.

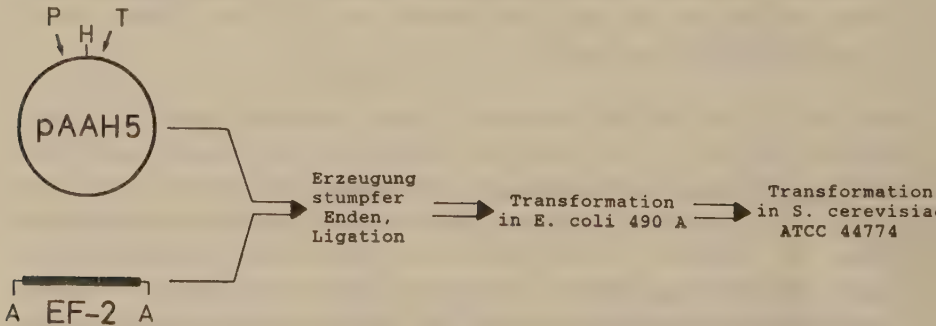


Abbildung 24:

Vorgehensweise zur Klonierung des *M. vannielii* EF-2 in Hefe.

A=AccI, H=HindIII, P=ADHI-Promotor, T= ADH-Terminator.

Ein AccI-Fragment aus dem Plasmid pTU 66, welches das Gen für EF-G (EF-2) vollständig enthält, sowie der mit HindIII lineari- sierte Hefe-Expressionsvektor pAAH 5 (Ammerer, 1983) wurden mit

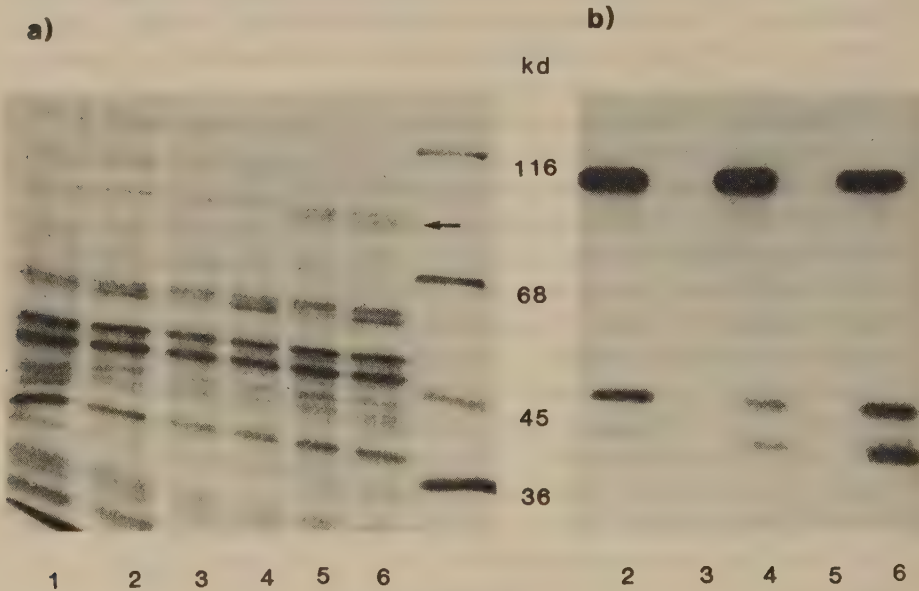
stumpfen Enden versehen und ligiert. In pAAH 5 liegt der Promotor der Alkoholdehydrogenase proximal zu einer singulären HindIII-Spaltstelle. Mit den rekombinanten Plasmiden wurde *E. coli* 490 A transformiert. Klone, die das Gen für EF-2 in der zur Expression erforderlichen Orientierung, bzw. in der umgekehrten Orientierung und solche, die nur das Vektorplasmid enthielten, wurden selektiert. Aus diesen Klonen wurden die Plasmide reisoliert und mit der gewonnenen DNS wurde der Hefestamm ATCC 44774 transformiert. Selektion von Transformanten erfolgte auf Medium ohne Leucin. Die Transformation der rekombinanten Plasmide in Hefe wurde freundlicherweise von Frau Vera Forsbach ausgeführt.

In Hefe ist eine schnelle Überprüfung von Transformanten durch Plasmid-Minipräparationen wegen zu geringer DNS-Ausbeute nicht möglich. Mit der aus Transformanten isolierten DNS wurde deshalb nochmals *E. coli* 490 A transformiert. Die Plasmide in den dabei erhaltenen Klonen wurden mittels Restriktionsenzymen überprüft.

Das EF-2-Gen konnte in beiden Orientierungen im Vektor pAAH5 in Hefe stabil erhalten werden. Wie aus Abbildung 25 a hervorgeht, taucht bei dem Klon, der das EF-2-Gen in der zur Expression nötigen Orientierung enthält, eine zusätzliche Bande auf, die einem Protein vom Molekulargewicht 80000 entspricht (Spur 4-6). Das Gen für EF-2 aus *Methanococcus* wird also in Hefe exprimiert.

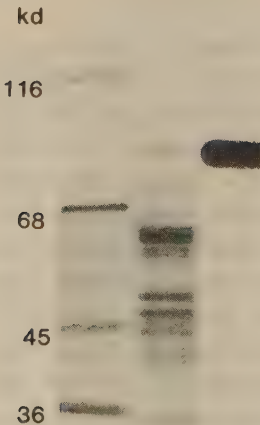
Die ADP-Ribosylierung von Hefezell-Rohextrakten mit Diphtherietoxin und ^{32}P -NAD lieferte ein intensives Signal bei 96 kD (Abbildung 25, Spur 2, 4 und 6). Diese Größe entspricht der des EF-2 aus Hefe. Zusätzliche, schwache Banden tauchen gleichermaßen bei allen drei Klonen auf. In Rohextrakten von *M. vannielii* konnte unter gleichen Bedingungen der archaebakterielle EF-2 ADP-ribosyliert werden (Abbildung 25c). Hohe Konzentrationen (10 µg/Ansatz) des Diphtherietoxins hemmen die ADP-Ribosylierung. Eine Markierung, die der 80 kD-Bande, also dem *M. vannielii* EF-2 entspräche, konnte auch bei langer Exponierdauer in den Hefeklonen nicht gefunden werden. Dies bedeutet, daß das Gen für *Methanococcus* EF-2 zwar exprimiert, das Genprodukt aber nicht

ADP-ribosyliert wird und damit auch, daß das Modifikationssystem der Hefe den *M. vanniellii* EF-2 nicht erkennen kann. Der archaebakterielle EF-2 ist offensichtlich dem eukaryotischen Faktor zu wenig ähnlich um als Substrat für das histidinmodifizierende System dienen zu können.



c)

Abbildung 25:



a) SDS-Polyacrylamidgel von Hefezell-Rohextrakten nach Behandlung mit Diphtherietoxin. 1-2 Hefestamm ATCC 44774 mit Vektorplasmid pAAH5. 3-4 Hefestamm mit *M. vanniellii* EF-2-Gen in falscher Orientierung, 5-6 mit *M. vanniellii* EF-2-Gen in zur Expression richtiger Orientierung. 7 Längenstandard. Ansätze in 2, 4, 6 enthielten 1 µg Diphtherietoxin 1, 3, 5 enthielten kein Toxin. b) Autoradiographie des abgebildeten Gels. c) 1 SDS-Polyacrylamidgel von *M. vanniellii* Rohextrakten, 2 zugehöriges Autoradiogramm.

DISKUSSION

Die Untersuchung der Struktur von Bestandteilen des Translationsapparates aus dem Archaeobakterium *M. vanniellii* hatte zum Ziel,

- i) Einblick in die Organisation von Genen, die für Proteine des Translationsapparates codieren, zu gewinnen;
- ii) die strukturelle Basis des Verhaltens von Archaeobakterien gegenüber Inhibitoren der Proteinbiosynthese zu analysieren;
- iii) mit Hilfe vergleichender Untersuchungen von Aminosäuresequenzen zusätzliche Aussagen über die phylogenetische Stellung der Archaeobakterien zu erhalten.

Organisation von Genen für ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren in *M. vanniellii*

In *E. coli* sind im sogenannten Streptomycin-Operon die Gene für die ribosomalen Proteine S12 und S7, sowie für die Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu zusammengefasst. Die gleiche Abfolge der Gene *rpsL* (S12), *rpsG* (S7), *fus* und *tuf* findet sich auch in *Micrococcus* (Ohama et al., 1987) und *Spirulina platensis* (Tiboni und Di Pasquale, 1987), scheint also in Eubakterien generell konserviert zu sein.

Die Analyse des *M. vanniellii* Genoms ergab für diese Gene eine identische Organisation. Allerdings finden sich in dem archaeobakteriellen Operon zusätzliche Gene. Es sind dies die Gene für das zu S10 homologe Protein, sowie zwei weitere, möglicherweise ribosomale Proteine. Diese Organisation wurde also über große evolutionäre Distanzen hinweg, nämlich mindestens seit der Aufspaltung von Eu- und Archaeobakterien konserviert. Möglicherweise ist die Reihenfolge der Gene für das Assembly der Ribosomen

wichtig (Dabbs, 1986).

Daten aus neuerer Zeit belegen das Vorhandensein von Operonstrukturen auch für andere archaebakterielle Gene. So sind beispielsweise Gene für RNS-Polymerasen aus *Sulfolobus* (Pühler et al., im Druck), Methyl-CoM-Reduktasen aus *Methanobacterium* (Mb) *thermoautotrophicum* (Bonkranz et al., 1988), rRNS und tRNS aus verschiedenen Archaebakterien (Böck et al., 1986) in Transkriptionseinheiten organisiert.

Die Zusammenfassung von Genen zu funktionellen Einheiten scheint damit ein in Archaebakterien generell verwirklichtes Prinzip zu sein, das diese mit den Eubakterien gemeinsam haben.

Struktur und Organisation der untersuchten Gene bzw. ihrer Genprodukte nähren durch ihre Konserviertheit die Vermutung einer vergleichbaren Regulation in *E. coli* und *Methanococcus*.

Für *E. coli* wurde für Operonen von Genen ribosomaler Proteine eine Feedback-Regulation postuliert (Fallon et al., 1979). In diesem Modell wirken nicht gebundene ribosomale Proteine als Feedback-Inhibitoren der Translation ihrer eigenen mRNA. Beim Streptomycin-Operon ist es das ribosomale Protein S7, welches die Regulation des Operons vermittelt. Wie neuerdings für das L11-Operon aus *E. coli* gezeigt wurde (Thomas und Nomura, 1987), kann die mRNA eine Sekundärstruktur ausbilden, die der Bindestelle des ribosomalen Proteins L1 an der 23S rRNS sehr ähnlich ist. Für die Regulation des S10 Operons aus *E. coli* wurde ebenfalls eine solche Sekundärstruktur gefordert (Freedman et al., 1987). Ein vergleichbarer Mechanismus, also eine Bindung von S7 wahlweise an 16S rRNS oder mRNA, ist auch bei der Regulation des "Streptomycin-Operons" aus *M. vanniellii* vorstellbar.

Deshalb wurde untersucht, ob:

- i) Sequenzähnlichkeit zwischen den Leader-Regionen der Operonen aus *E. coli* und *M. vanniellii* vorhanden ist;
- ii) Sequenzähnlichkeit zwischen der Leader-Region aus *M. vanniellii* und einer Region der 16S rRNS aus diesem Organismus besteht;

iii) in der Leadersequenz des Operons eine Bäumchenstruktur ausgebildet werden kann, wie sie in ähnlicher Form beim L11/L1 Operon aus *E. coli* gefunden wird.

Sequenzähnlichkeiten der Leaderregion konnten nicht gefunden werden. Der das Operon flankierende Bereich enthält zwar längere Sequenzwiederholungen, diese liegen aber stromauf des Promotors, kommen also für eine regulatorische Funktion wohl nicht in Frage. Möglich ist auch, daß die Regulation nicht durch das Homologe zu S7, sondern durch ein anderes der in diesem Operon codierten Proteine vermittelt wird.

Um Information über Regulation der Genexpression zu gewinnen, wird es nötig sein, die Expression der *M. vanniellii*-Gene in *E. coli* zu analysieren. Weiterhin erscheinen Untersuchungen im homologen System sinnvoll sobald ein funktionsfähiges Transformationssystem zur Verfügung steht.

Vergleicht man die Abfolge der stromaufwärts des Gens für S12 gelegenen Gene mit der Organisation in *H. halobium* und *S. acidocaldarius* (siehe Abbildung 26), so findet man eine erstaunliche Ähnlichkeit in der Abfolge der Gene.

Zunächst sind es die Gene für die Untereinheit C (entsprechend β') der RNS-Polymerasen, die innerhalb der Archaeobakterien hohe Ähnlichkeit aufweisen (vergleiche Tabelle 13). Der in *Methanococcus* auf das Gen für die RNS-Polymerase folgende offene Leserahmen (ORF 1) findet eine Entsprechung in *Sulfolobus* (*S. acidocaldarius* (Pühler et al., 1988)). Das durch den dort vorhandenen offenen Leserahmen codierte Protein hat 37 % identische Aminosäurepositionen mit der C-terminalen Hälfte des zu ORF 1 gehörigen Proteins. Das Protein zeigt weiterhin 36 % Ähnlichkeit zum ribosomalen Protein L30 aus der Ratte. In *H. halobium* fehlt ein homologer offener Leserahmen ebenso wie in Eubakterien. Setzt man dieses Ergebnis nun in Beziehung zur Zahl der ribosomalen Proteine in den einzelnen Organismen, so ergibt sich folgendes Bild:

M. vannielii mit 60-62 ribosomalen Proteinen sowie *S. acidocaldarius* mit 61-64 ribosomalen Proteinen (Schmid und Böck, 1982) enthalten ein zu L30 aus der Ratte (84 ribosomale Proteine; Otaka und Osawa, 1981) homologes Protein, während es in *H. halobium* (53 ribosomale Proteine; Schmid und Böck, 1982) und *E. coli* (55 ribosomale Proteine; Wittmann-Liebold und Kimura, 1984) fehlt. Diesem Protein kommt daher wahrscheinlich keine essentielle Funktion in der Proteinbiosynthese zu. Es könnte im Verlauf einer Entwicklung verlorengegangen sein, die über Minimierung der Zahl der Proteine zu einer Optimierung des Translationsapparates und damit zu einer Verkürzung der Generationszeit führte (Wool, 1979).

Der an ORF 1 anschließende offene Leserahmen, in Abbildung 26 mit ORF 2 bezeichnet, konnte mit keinem eubakteriellen oder eukaryotischen Protein homologisiert werden.

Innerhalb der Archaeobakterien sind die ORF 2-Genprodukte homolog. Die Homologie beträgt zwischen *H. halobium* und *M. vannielii* 31.7 %, zwischen *S. acidocaldarius* und *M. vannielii* 30.5 % und zwischen *H. halobium* und *S. acidocaldarius* 37.0 %.

Wie in *M. vannielii* folgt auch in *Sulfolobus* und *Halobakterium* auf ORF 2 das Gen für das ribosomale Protein S12. Die Konservierung der Aminosäuresequenz innerhalb der Archaeobakterien beträgt hierbei zwischen 62.3 % und 66.7 %.

Die weitgehende Konservierung der Organisation dieser Gene in den drei genannten Archaeobakterien kann als weiterer Beweis für die Kohärenz des Organismenreiches Archaeobakterien gewertet werden.

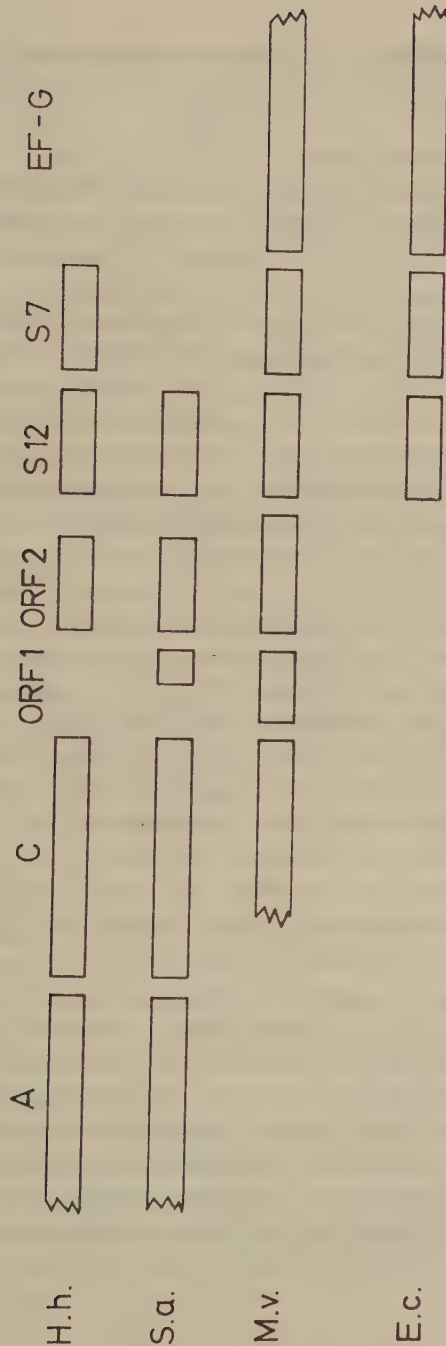


Abbildung 26:

Organisation von Genen aus *M. vanniellii* im Vergleich zu der Situation in *H. halobium* (H. Leffers, pers. Mitteilung), *S. acidocaldarius* (G. Pühler, pers. Mitteilung) und *E. coli* (Post und Nomura, 1980).

Strukturelle Basis des Verhaltens von Archaeobakterien gegenüber Inhibitoren der Proteinbiosynthese

Der archaeobakterielle Translationsapparat zeigt, wie in vielen anderen Eigenschaften, auch hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber Inhibitoren eine Mittelstellung zwischen Eubakterien und Eukaryonten.

Die Wirkung von Inhibitoren auf das Ribosom der Archaeobakterien wurde in der Vergangenheit eingehend untersucht (Böck und Kandler, 1985; Hummel und Böck, im Druck). Es konnte gezeigt werden, daß eine ganze Reihe in Eubakterien wirksamer Antibiotika in Archaeobakterien inaktiv sind. Auf der anderen Seite wirken viele Inhibitoren der Eukaryonten auch auf die Translation der Archaeobakterien. Ein Hemmstoff, der ausschließlich gegen Archaeobakterien wirksam ist, wurde bisher nicht gefunden.

Die Inhibition der Translation kann entweder direkt am Ribosom und zwar sowohl an ribosomalen Proteinen, als auch an der ribosomalen RNS oder aber an den Elongationsfaktoren angreifen. Noch vor kürzerer Zeit galt allgemein die Auffassung, die Funktion der ribosomalen RNS beschränke sich auf die Stabilisierung der Raumstruktur des Ribosoms. Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß die RNS auch entscheidend in die Funktion des Ribosoms eingreift. Die strukturelle Basis von Resistenzen, die auf Veränderungen der rRNS beruhen, wurde eingehend untersucht (als Übersichtsartikel siehe: Hummel und Böck, im Druck) und bleibt deshalb hier unberücksichtigt.

Auf der anderen Seite wurde die grundlegende Bedeutung der meisten ribosomalen Proteine für die einwandfreie Funktion der Translation nicht zuletzt durch Mutationen in diesen Proteinen bestätigt, die Resistenz gegen Antibiotika vermitteln. Da mit der DNS-Sequenz Strukturdaten zu mehreren archaeobakteriellen ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren gewonnen wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, eine Korrelation zwischen Resistenz oder Sensitivität gegenüber Inhibitoren und der

Struktur einzelner Proteine herzustellen.

Streptomycin

Zunächst soll auf ein Antibiotikum eingegangen werden, das direkt am Ribosom wirksam ist, nämlich Streptomycin. Streptomycin hemmt die Translation in Eubakterien, nicht dagegen in Archaeobakterien und Eukaryonten (Hummel et al., 1986). Streptomycin-resistente Mutanten von *E. coli* sind entweder in der 16S rRNS mutiert (Montandon et al., 1985) oder aber im ribosomalen Protein S12 (Hummel und Böck, im Druck).

Bei Mutationen des ribosomalen Proteins S12 führt sowohl der Austausch des Lysins an Aminosäureposition 42 gegen Arginin, Aspartat oder Threonin, als auch der Ersatz des Lysins an Position 87 durch Arginin zu Streptomycinresistenz (Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974). Die Position 42 ist in *M. vanielii* nicht verändert. Der Primärstrukturbereich um Aminosäureposition 87 ist in Abbildung 27 wiedergegeben.

<i>M. vanielii</i>	EVVIEGIGGPS	Q	A	K	G	D	I	P	G	V	R	Y	K	V
<i>E. gracilis</i>	LI-----	R	G	G	R	V	K	D	L	P	G	V	K	Y
<i>M. polymorpha</i>	LV-----	R	G	G	R	V	K	D	L	P	G	V	R	Y
<i>N. tabacum</i>	LV-----	R	G	G	R	V	K	D	L	P	G	V	R	Y
<i>E. coli</i>	LI-----	R	G	G	R	V	K	D	L	P	G	V	R	Y

↓
R → Sm^r

Abbildung 27:

Vergleich eines Abschnittes des ribosomalen Proteins S12 von *M. vanielii* und mehreren Eubakterien. Der Pfeil kennzeichnet die Aminosäureposition 87.

Die Region um Lysin 87 in *E. coli* ist zu den anderen Eubakterien und auch zu *M. vanielii* sehr gut konserviert. Anstelle von Lysin besitzt *Methanococcus* an dieser Position ein Glycin. Ob der Austausch Lysin gegen Glycin in Archaeobakterien jedoch allein für die Ausbildung von Hochresistenz gegen Streptomycin hinreichend ist, kann aus diesem Befund noch nicht abgeleitet werden. Erst

durch einen Austausch von Lysin gegen Glycin in *E. coli*, oder von Glycin zu Lysin in *M. vanniellii*, könnte bei entsprechender Änderung des Resistenzmusters diese Frage geklärt werden.

Kirromycin

Das Antibiotikum Kirromycin hemmt spezifisch die Funktion des Elongationsfaktors Tu (Wolf und Fischer, 1979). Kirromycin wirkt nur auf die eubakterielle nicht jedoch auf die archaebakterielle Proteinbiosynthese (Londei et al., 1986).

Kirromycinresistente Mutanten von *E. coli* wurden von Swart et al. (1982) isoliert und charakterisiert. In diesen Mutanten ist die Aminosäure Alanin an Position 375 gegen Valin bzw. Threonin ausgetauscht. Die Substitution von Alanin gegen Valin führt zu 70fach höherer Resistenz, die gegen Threonin zu 230fach höherer Resistenz als im Wildtyp. Wie aus Abbildung 8 entnommen werden kann, besitzt EF-1 α (EF-Tu) aus *M. vanniellii* innerhalb eines gut konservierten Sequenzbereiches an dieser Position, wie der Wildtyp von *E. coli*, ein Alanin, ist aber um den Faktor 1000 resistenter als *E. coli*. Dies bedeutet, daß der Austausch des Alanins an Position 375 zur Erklärung der reduzierten Wirkung von Kirromycin allein nicht ausreicht. Es muß zusätzliche Strukturelemente geben, die die Wirkung des Antibiotikums beeinflussen.

Diphtherietoxin

Ein weiterer Effektor der Proteinbiosynthese, dessen Wirkung sich gegen einen Elongationsfaktor richtet, ist das Diphtherietoxin. Diphtherietoxin ADP-ribosyliert spezifisch eine Position des EF-2 von Eukaryonten und Archaebakterien. Einen Vergleich dieser Region, die in Eukaryonten und Archaebakterien Diphthamid, ein modifiziertes Histidin, enthält, zeigt Abbildung 28.

↓

HAMSTER	RFDV	HDV	TL	AD	AI	HR	GG	QI	IP	TA	RR	CL	YA	SV	LT	AP	RI	ME	P
M. vannieli	KIKL	LD	AT	FI	ED	AI	HR	GP	SI	IP	PA	IR	FG	VR	DA	VSS	AK	PI	LL
E. coli	FGSV	HDV	DS	SE	TA	-----					FK	LA	AS	IA	FG	KE	GFK	AK	PV

Abbildung 28:

Vergleich der ADP-ribosylierbaren Region des EF-2 aus Hamster und M. vannieli mit der Sequenz von EF-G aus E. coli. Dargestellt sind die aus der DNS-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Das im Protein modifizierte Histidin ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Sequenzen des EF-2 aus Hamster und M. vannieli zeigen in diesem Bereich hohe Ähnlichkeit. In E. coli dagegen weist diese Region eine stark veränderte Struktur auf. Ein Histidin fehlt in der Umgebung dieses Sequenzabschnittes völlig.

Überlegungen zur phylogenetischen Stellung der Archaeobakterien

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz des EF-1 aus M. vannieli bietet erstmals die Möglichkeit, anhand eines hochkonservierten Proteins aussagekräftige phylogenetische Vergleiche anzustellen. Der aus den phylogenetischen Distanzen der Tabelle 1 erstellte Stammbaum von EF-Tu (EF-1a) (Abbildung 29) erlaubt dabei folgende Schlüsse:

- i) das Konzept der Trichotomie der Organismenreiche wird durch den EF-Tu-Stammbaum klar bestätigt;
- ii) der Abzweigungspunkt der Archaeobakterien liegt verglichen mit 16S- und 23S-Stammbäumen deutlich weiter auf der eukaryotischen Seite.

Zu Punkt (ii) ist jedoch anzumerken, daß eine zweite archaeobakterielle Sequenz bisher fehlt, folglich nicht mit Sicherheit von einer monophyletischen Abzweigung des archaeobakteriellen Astes ausgegangen werden kann.

Archaeobacteria

Methanococcus vannielii

Eukaryota

Artemia salina

Mucor racemosus

Saccharomyces cerevisiae

Eubacteria

Saccharomyces cerevisiae (Mito)

Escherichia coli

Euglena gracilis (Chl)

50

Abbildung 29:

Stammbaum der EF-Tus basierend auf den phylogenetischen Distanzen aus Tabelle 1

Um die Folgerungen aus dem auf EF-Tu (EF-1 α)-Sequenzen basierenden Stammbaum abzusichern, war der Vergleich weiterer Proteine notwendig. Die Werte der % Ähnlichkeit der C-terminalen Abschnitte verschiedener RNS-Polymerasen ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12:

Vergleich von 200 Aminosäuren des C-Terminus der β' (C)-Untereinheit von RNS-Polymerasen. Aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde die RNS-Polymerase II, aus *E. coli* die β' - Untereinheit der RNS-Polymerase für den Vergleich herangezogen. Die Daten für *H. halobium* und *S. acidocaldarius* stammen von Pühler et al. (im Druck). Verglichen wurde die Ähnlichkeit der Sequenzen in %.

	1	2	3	4	5
1 <i>M. vannielii</i>	-				
2 <i>H. halobium</i>	54.3	-			
3 <i>S. acidocaldarius</i>	52.4	57.1	-		
4 <i>Sacch. cerevisiae</i>	36.1	35.7	39.4	-	
5 <i>E. coli</i>	28.5	30.6	31.9	27.5	-

Die monophyletische Abstammung der methanogenen, halophilen und schwefelabhängigen Archaeobakterien wird durch diese Daten bestätigt. Die Ähnlichkeit der archaeobakteriellen zu den eukaryotischen Polymerase-Sequenzen ist wiederum höher als zu den eubakteriellen.

Identische Aussagen liefern die Vergleiche der EF-2 Sequenzen (Tabellen 5 und 6) und des ribosomalen Proteins S8 (E. coli Nomenklatur; J. Auer, pers. Mitteilung).

Das für den EF-Tu gefundene Bild wird also bestätigt, nämlich daß archaebakterielle Proteine im Vergleich zu ribosomaler RNS offenbar generell eine mehr eukaryotische Primärstruktur aufweisen.

Daraus muß gefolgert werden, daß die Evolutionsrate von ribosomaler RNS und (ribosomalen) Proteinen unterschiedlich groß gewesen sein muß.

Berücksichtigt man die Argumente von Darnell und Doolittle (1986), Gilbert (1986) und Clark (1987) zur frühen Evolution, so ist die in Abbildung 30 schematisch dargestellte Entwicklung der drei Organismenreiche denkbar.

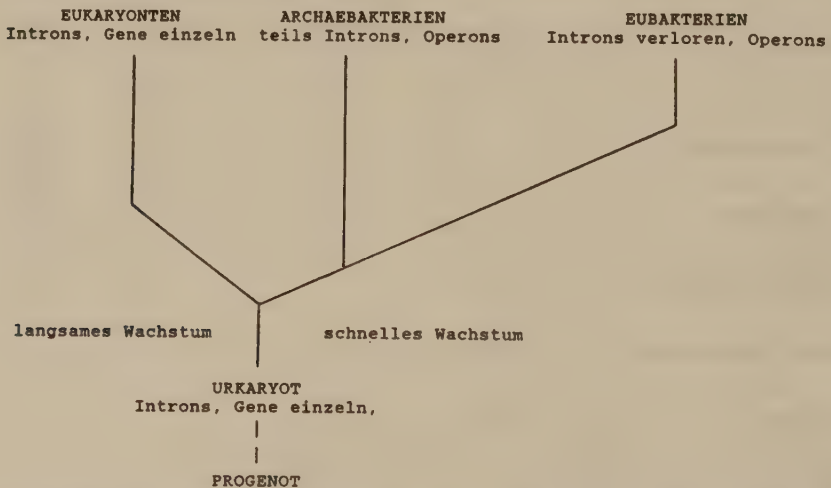


Abbildung 30:

Schema zum möglichen Verlauf der frühen Evolution von Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryonten.

Ausgehend von ursprünglich einzeln liegenden Genen begünstigte die Tendenz zur Verkürzung der Generationszeit bei Archaeobakterien und Eubakterien die koordinierte Expression zusammengehöriger Gene und die Gruppierung solcher Gene in Operons.

Die hohe Konserviertheit in der Organisation von Genen des Translationsapparates von *M. vanniellii* und *E. coli* (J. Auer pers. Mitteilung, diese Arbeit) macht es wahrscheinlich, daß diese Anordnung der Gene schon vor der Aufspaltung von Eu- und Archaeobakterien vorhanden gewesen sein muß. Nach der Abtrennung der Eukaryonten müssen die beiden Organismenreiche eine Strecke gemeinsamer Entwicklung durchlaufen haben.

Introns, die ebenfalls als ursprünglich klassifiziert wurden, (Gilbert, 1986) blieben in Eukaryonten, teilweise auch in Archaeobakterien erhalten. In Eubakterien gingen sie im Zuge einer Optimierung der Zelle in Richtung einer maximalen Teilungsrate verloren. Auch die Reduktion der Zahl an ribosomalen Proteinen kann als Ausdruck eines solchen "Streamlining" gewertet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung des Translationsapparates lieferte in der Vergangenheit wesentliche Argumente für die phylogenetische Einordnung der Archaeobakterien. In erster Linie war dabei die stabile RNS Gegenstand der Betrachtungen.

Die Analyse von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren aus *Methanococcus vannielii* in der vorliegenden Arbeit sollte weitere Kriterien für die Taxonomie der Archaeobakterien sowie Einblicke in funktionelle Zusammenhänge der Translation liefern. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Das Gen, welches für den Elongationsfaktor 1 α (EF-Tu) aus *M. vannielii* codiert, wurde mittels heterologer Hybridisierung und sequenzieller Klonierung isoliert. Expression des Gens in *E. coli* konnte immunologisch nachgewiesen werden.
- 2) Die aus der DNS-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des EF-1 α ergab wesentlich höhere Ähnlichkeit dieses Proteins zu denjenigen aus Eukaryonten als zu EF-Tu aus Eubakterien.
- 3) In der Nachbarschaft des Gens für EF-1 α konnten die Gene für EF-2 sowie für mehrere ribosomale Proteine lokalisiert werden. Speziell wurden Gene homolog zu denen der ribosomalen Proteine S12, S7, S10 aus *E. coli* und L30 (ORF 1) aus *Rattus norvegicus* identifiziert.

Durch Northernblot-Analysen und S1-Kartierung konnte die Organisation der Gene für ORF 1 (L30), ORF2, S12, S7, EF-2, EF-1 α und S10 in einem Operon gezeigt werden, das dem Streptomycin-Operon von *E. coli* ähnelt. In *Methanococcus* sind in diesem Operon allerdings drei zusätzliche Proteine vorhanden. Während nämlich das Gen für das ribosomale Protein S10 in *E. coli* 15 kb von *tuf A* entfernt ist und

einem anderen Operon angehört, beträgt der Abstand der entsprechenden Gene in *M. vannielii* nur 56 Basen.

Zwei Gene aus dem "Streptomycin"- Operon von *M. vannielii* zeigen keine Homologie zu Genen ribosomaler Proteine aus *E. coli*. Es könnte sich dabei um Gene "zusätzlicher" ribosomaler Proteine von *Methanococcus* handeln.

- 4) Direkt angrenzend an das "Streptomycin"- Operon wurde in *M. vannielii* ein Gen lokalisiert, welches demjenigen für die RNS-Polymerase II aus Eukaryonten homolog ist.
- 5) Die Struktur des gefundenen Promotors entspricht der Consensussequenz für den archaebakteriellen Promotor. Der Terminator des Operons ähnelt rho-unabhängigen Terminatoren wie sie von Eubakterien bekannt sind.
- 6) In einigen Fällen konnten Anhaltspunkte für die strukturelle Basis der Resistenz bzw. Sensitivität gegen Inhibitoren der Proteinbiosynthese in Archaeobakterien (Kirromycin ; Streptomycin; Diphtherietoxin) gewonnen werden.

Die Ergebnisse belegen eine "eubakterielle" Organisation der untersuchten Gene, während die Struktur dieser Proteine, im Gegensatz zu den Resultaten der rRNS-Analysen, mehr "eukaryotischen" Charakter aufweist. Daraus lassen sich folgende Forderungen ableiten:

- a) ribosomale Proteine und rRNS in Archaeobakterien weisen eine unterschiedliche Evolutionsrate auf.
- b) Archaeobakterien und Eubakterien durchliefen nach Abspaltung der Eukaryonten einen gemeinsamen Entwicklungsabschnitt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

-
- Allison R, Moyle LA, Shales M, Ingles CJ (1985) Cell 42: 599-610
- Ammerer G (1983) Methods in Enzymology 101: 192-201
- An G, Friesen JD (1980) Gene 12: 33-39
- Arai K, Clark BFC, Duffy L, Jones MD, Kaziro Y, L'Italian J, Miller DL, Nagarkatti S, Nakamura S, Nielsen KM, Petersen TE, Takahashi K, Wade M (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 1326-1330
- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979) Microbiological Reviews 43: 260-296
- Beauclerk AAD, Hummel H, Holmes DJ, Böck A, Cundliffe E (1985) Eur J Biochem 151: 245-255
- Beckler GS, Reeve JN (1986) Mol Gen Genet 204: 133-140
- Benson SA (1984) Bio Techniques, March/April: 66-67
- Berk AJ, Sharp PA (1977) Cell 12: 721-732
- Betlach M, Friedman J, Boyer HW, Pfeifer F (1984) Nucl Acids Res 12: 7949-7959
- Birnboim C, Doly J (1979) Nucl Acids Res 7: 1513-1523
- Böck A, Kandler O (1985) In: Woese CR, Wolfe R (ED) The Bacteria Vol VIII, Academic Press, London
- Böck A, Hummel H, Jarsch M, Wich G (1986) In: Biology of anaerobic Bacteria. Dubouguier et al. (Ed) Elsevier, Amsterdam

- Bokranz M, Bäumner G, Allmansberger R, Ankel-Fuchs D, Klein A
(1988) *J Bact* 170: 568-577
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL,
Boyer HW (1977) *Gene* 2: 95-113
- Brands J, Maassen JA, Van Hemert FJ, Amons R, Möller W *Eur J
Biochem* 155: 167-171
- Casey J, Davidson N (1977) *Nucleic Acids Res* 5: 1539-1543
- Chang ACY, Cohen SN (1978) *J Bact* 134: 1141-1156
- Chen EJ, Seeburg PH (1985) *DNA* 4: 165-170
- Clark CG (1987) *J Mol Evol* 25: 343-350
- Clarke L, Carbon J (1976) *Cell* 9: 91-99
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69:
2110-2114
- Cotrelle P, Thiele D, Price VL, Memet S, Micouin JY, Marck C,
Buhler JM, Sentenac A, Fromageot P (1985) *J Biol Chem* 260: 3090-
3096
- Cue D, Beckler GS, Reeve JN, Konisky J (1985) *Proc Natl Acad Sci
USA* 82: 4207-4211
- Dabbs Er (1986) In: *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes*
Hardesty B, Kramer G (Ed), Springer, New York
- Darnell JE, Doolittle WF (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1271-
1275
- Davis RW, Botstein D, Roth JR (1980) *Advanced Bacterial Genetics*.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

- Dever TE, Glynnias MJ, Merrick WC (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84: 1814-1818
- Douglas SE, Doolittle WF (1984) Nucl Acids Res 7: 3373-3386
- Dreiseikelmann B, Eichenlaub R, Wackernagel W (1979) Biochim Biophys Acta 562: 418-428
- Dretzen G, Bellare M, Sassone-Cossi P, Chambon P (1981) Anal Biochem 112: 295-298
- Dunn R, Mc Coy J, Simsek M, Majundar A, Chang SH, Rajbhandry UL, Khorana HG (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78: 6744-6748
- Fallon AM, Jinks CS, Strycharz GD, Nomura M (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 7540-7547
- Filer D, Furano AV (1981) J Bact 148: 1006-1011
- Fitch WM, Margoliash E (1967) Science 155: 279-284
- Fox GE (1985) In: Woese CR, Wolfe RS (Ed) Bacteria VIII Academic Press; New York, London
- Fraenkel DG, Neidhardt FC (1961) Biochim Biophys Acta 53: 96-100
- Freedman LP, Zengel JM, Archer RH, Lindahl L (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84: 6516-6520
- Garvey S, Cremer NE, Sussdorf DH (1977) Methods in Immunology. Benjamin WA Inc., Reading, Massachusetts
- Gehrmann R, Henschen A, Klink F (1985) FEBS Lett 185: 37-42
- Gilbert W, Marchionini M, Mc Knight G (1986) Cell 46: 151-154

- Hamilton PT, Reeve JN (1985) J Mol Evol 22: 351-360
- Henikoff S (1984) Gene 28: 351-359
- Hohn B, Collins J (1980) Gene 11: 291-298
- Holmes WM, Platt T, Rosenberg M (1983) Cell 32: 1029-1032
- Honjo T, Nishizuka Y, Hagaishi O, Kato J (1968) J Biol Chem 243: 3553-3555
- Hori H, Osawa S (1987) Mol Biol Evol 4: 445-472
- Hummel H, Böck A (1987) Nucl Acids Res 15: 2431-2443
- Hummel H, Böck A (Im Druck)
- Hummel H, Jarsch M, Böck A (1986) Microbiology : 370-374
- Hwang YW, Miller D (1987) J Biol Chem 262: 13081-13085
- Jarsch M, Böck A (1985) System Appl Microbiol 6: 54-59
- Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Gene Anal Techn 1: 3-8
- Jonak J, Petersen TE Clark BFC, Pychlik J (1982) FEMS Lett 150: 485-488
- Jonak J, Pokorna K, Meloun B, Karas K (1986) J Biochem 154: 355-362
- Jones WJ, Nagle D, Withman WB (1987) Microbiol Reviews 51: 135-177
- Jurnak F (1985) Science 230: 32-36

- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 3309-3312
- Kandler O, König H (1985) In : The Bacteria. Wolfe RS, Woese CR (Ed) Vol VIII Academic Press; New York, London
- Kessel M, Klink F (1980) Nature 287: 250-251
- Khono K, Uchida T, Ohkubo H, Nakanishi S, Nakanishi T, Fukui T, Ohtsuka E, Ikehara M, Okada Y (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83: 4978-4982
- Kimura J, Arndt E, Kimura M (1987) FEBS Lett 224: 65-70
- Kimura J, Kimura M (1987) J Biol Chem 262: 12150-12157
- Kjems J, Garrett RA (1985) Nature 318: 675-677
- Klink F (1985) Elongation factors. In: Woese CR, Wolfe R (Herausgeber) The bacteria, vol. VIII, Archaeobacteria. Academic Press, London
- Kushiro M, Shimizu M, Tomita K (1987) Eur J Biochem 170: 93-98
- La Cour TFM, Nyborg J, Thirup S, Clark BFC (1985) EMBO 4: 2385-2388
- Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685
- Langworthy TA, Tornebene TG, Holzer G (1982) Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C 3: 228-244
- Landsmann J, Kröger M, Hobom G (1982) Gene 20: 11-24
- Larson R, Messing J (1983) DNA 2: 31-35
- Lechner K, Böck A (1987) Molec Gen Genet 208: 523-528

- Leffers H, Kjems J, Osterguard L, Larsen N, Garrett R (1987) J Mol Biol 195: 43-61
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker (1977) Biochemistry 16: 4743-4751
- Lenstra JA, Vliet AV, Arnberg AC, Van Henert FJ, Möller W (1986) Eur J Biochem 155: 475-483
- Linz JE, Lira LM, Sypherd PS (1986) J Biol Chem 261: 15022-15029
- Linz JE, Sypherd PS (1987) Mol Cell Biol 7: 1925-1932
- Londei P, Luis Sanz J, Altamura S, Hummel H, Cammarano P, Amils R, Böck A, Wolf H (1986) J Bact 167: 265-271
- Lucas-Lenard J, Lipmann F (1966) Proc Natl Acad Sci 55: 1562-1566
- Maessen GDF, Amons R, Zeelen JP, Möller W (1987) FEBS Lett 223: 181-186
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Marmur J (1961) J Mol Biol 3: 208-218
- Matheson AT, Louie KA, Böck A (1988) FEBS 321: 331-335
- Maxam AM, Gilbert W (1980) Methods in Enzymology 65: 499-560
- Messing J (1983) Methods in Enzymol 101: 20-78
- Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY
- Montandon PE, Nicolas P, Schürmann P, Stutz E (1985) Nucl Acids

Res 13: 4299-4311

Montandon PE, Stutz E (1983) Nucl Acids Res 11: 5877-5892

Montandon PE, Stutz E (1984) Nucl Acids Res 12: 2851-2859

Muto A, Osawa S (1987) Proc Natl Acad Sci Usa 84: 166-169

Müller B, Allmansberger R, Klein A (1985) System Appl Microbiol
6: 54-59

Nagata S, Tsunetsuga-Yokota Y, Naito A, Kaziro Y (1983) Proc Natl
Acad Sci USA 80: 6192-6196

Nagata S, Nagashima K, Tsunetsuga-Yokota Y, Fujimura K, Miyazaki
M, Kaziro Y (1984) EMBO 3: 1825-1830

Nakanishi O, Oyanagi M, Kuwano J, Tanaka T, Nakayama T, Mitsui H,
Nabeshima YI Ogata K (1985) Gene 35: 289-296

Needleman SB, Wunsch CD (1970) J Mol Biol 48: 443-453

Nomura M, Held WA (1974) in: Ribosomes. Nomura et al (Ed) Cold
Spring Harbor Laboratory, New York

Nomura M, Gourse R, Baughman G (1984) Ann Rev Biochem 53: 75-117

Ohama T, Yamao F, Muto A, Osawa S (1987) J Bact 169: 4770-4777

Ohkubo S, Muto A, Kawauchi Y, Yamao F, Osawa S (1987) Mol Gen
Genet 210: 314-322

Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono
K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S (1986) Nature 322: 572-
574

Otaka E, Higo K, Osawa S (1982) Biochemistry 21: 4545-4550

- Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Guryev SO,
Salomatina JS, Shuvaeva TM, Lipkin VM, Sverdlov ED (1982) Nucl
Acids Res 10: 4035-4044
- Peacock AC, Dingmann CW (1969) Biochemistry 7: 668-674
- Piepersberg A, Hennecke H, Engelhard M, Nass G, Böck A (1975) J
Bacteriol 124: 1482-1488
- Post LE, Nomura M (1980) J Biol Chem 255: 4660-4666
- Pühler G, Leffers H, Gropp F, Lottspeich F, Palm P, Garrett R,
Zillig W (Im Druck)
- Royden CS, Pirrotta V, Jan LY (1987) Cell 51: 165-173
- Rüther U, Koenen M, Otto K (1981) Nucl Acids Res 9: 4087-4098
- Rüther U (1982) Nucl Acids Res 10: 5765-5772
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:
5463-5467
- Schaffner M (1976) Cell 8: 471-478
- Schenk TE, Rhodes C, Rigby PWJ, Berg P (1975) Proc Natl Acad Sci
USA 72: 989-993
- Schmid G, Böck A (1982) Zbl Bakt Hyg I Abt Orig C 3: 347-353
- Seidler L, Peter M, Meissner F, Sprinzl M (1987) Nucl Acids Res
15: 9263-9277
- Shine J, Dalgarno L (1974) Proc Natl Acad Sci USA 71: 1342-1346
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N,

- Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Sugiura M (1986) EMBO 5: 2043-2049
- Shuber A, Orr E, Recny MA, Schendel P, May H, Schauer N, Ferry JG (1986) J Biol Chem 261: 12942-12947
- Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW (1984)
Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY
- Slobin LJ, Clark RV, Olson MOJ (1983) Biochemistry 22: 1911-1917
- Southern EM (1975) J Mol Biol 98: 503-517
- Strobel O, Köpke A, Kamp RM, Böck A, Wittmann-Liebold B J Biol Chem (im Druck)
- Swart GWM, Kraal B, Bosch L, Parmeggiani A (1982) FEBS Lett 142: 101-106
- Thomas MS, Nomura M (1987) Nucl Acids Res 15: 3085-3096
- Tiboni O, Di Pasquale G, Cammarano P, Hummel H (1987) FEMS 44: 203-207
- Tiboni O, Di Pasquale G (1987) Biochim Biophys Acta 908: 113-122
- Thom M, Wich G (1988) Nucl Acids Res 16: 151-163
- Towbin H, Staechlin T, Gordon J (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354
- Ullrich A, Shine J, Chirwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, Goodman HM (1977) Science 196: 1313-1319
- Van Ness BG, Howard JB, Bodley JW (1980) J Biol Chem 255: 10710-10716

- Van Noort JM, Kraal B, Sinjorgo KM, Persoon NLM, Johanns ESD, Bosch L (1986) Eur J Biochem 160: 557-561
- Weaver RF, Weissmann C (1979) Nucleic Acids Res 7: 1175-1193
- Weil C, Beckler GS, Reeve JN (1987) J Bact 169: 4857-4860
- Wich G, Hummel H, Jarsch M, Bär U, Böck A (1986) Nucleic Acids Res 14: 2459-2479
- Wich G, Leinfelder W, Böck A (1987) Embo 6: 523-528
- Williams BG, Blattner FR (1979) J Virol 29: 555-575
- Wittmann-Liebold B, Kimura M (1984) In: Walker M (ed) Methods in molecular Biology, Vol 1, Proteins. The Humana Press Inc., Clifton, New Jersey
- Wittmann-Liebold B (1987) In: Structure, Functions and Genetics of Ribosomes. Hardesty B, Kramer G (Herausgeber) Springer Verlag, New York
- Wittmann HG, Wittmann-Liebold B (1974) In: Ribosomes. Nomura M, Tissieres A, Legey P (Ed) Cold Spring Harbor Laboratory
- Woese CR, Fox G (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74: 5088-5090
- Woese CR (1987) Microbiol Reviews 51: 221-271
- Wolf H, Fischer E (1979) In Antibiotics. Hahn FE (Ed) Springer, Berlin Heidelberg New York
- Wolin EA et al. (1963) J Biol Chem 238:288
- Wool IG (1980) In: Ribosomes. Structure Function and Genetics. Chambliss G et al. (Ed) University Park Press, Baltimore

- Wörner W, Glöckner C, Mierzowski M, Wolf H (1983) FEMS 18: 69-73
- Yaguchi M, Matheson AT, Visentin LP, Zuker M (1980) In: Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes. Osawa S, Ozeki H, Uchida H, Yura T (Ed) University of Tokyo Press
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Gene 33: 103-109
- Young A, Davis RW (1983) Science 222: 778-782
- Zengel JM, Archer RH, Lindahl L (1984) Nucl Acids Res 12: 2181-2192
- Zuckerkindl E, Pauling L (1965) J Theoret Biol 8: 357-366

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Böck für die intensive wissenschaftliche Förderung, für seine vielen hilfreichen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft aussprechen.

Herrn Prof. Dr. W. Zillig und Herrn Dr. P. Palm danke ich für ihre Unterstützung bei der Erstellung von Computeranalysen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. F. Klink für die Bereitstellung von EF-1 α aus *Methanococcus*, bei Herrn Dr. W. Ludwig für das Plasmid pGA 180.

Frau Gabi Heller möchte ich für die hervorragende technische Assistenz bei zahlreichen Versuchen herzlich danken.

Allen Kollegen am Lehrstuhl für Mikrobiologie, insbesondere aber Johannes Auer und Günter Wich, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. N. Hampp danke ich für wertvolle Hinweise.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Konrad Lechner
Geburtstag, Geburtsort:	18.08.1957, München
Familienstand:	Seit 21.07.1987 verheiratet mit Petra Lechner, geb. Geigl

Ausbildung:

1963-1968	Grund- und Hauptschule in München
1968-1977	Luitpold-Gymnasium München, Abitur
1977-1978	Grundwehrdienst
1978-1984	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1983-1984	Diplomprüfung und Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck
Ab Juli 1984	Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei Herrn Prof. Dr. A. Böck

